

Die Bedeutung von *TRAF6* Polymorphismen für die
monozytäre Immunantwort und das Risiko einer
spontan bakteriellen Peritonitis bei Patienten mit
hydropisch dekompensierter Leberzirrhose

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Martina Mai (geb. Klas)

geboren am 21.07.1986 in Gera

Gutachter: (akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort)

1. Prof. Dr. med. Andreas Stallmach, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Ignacio Rubio, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. med. Jochen Hampe, Universitätsklinikum Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 25.06.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	XI
1 Einleitung	1
1.1 Klinische Aspekte der Leberzirrhose mit spontan bakterieller Peritonitis	1
1.1.1 Leberzirrhose und Infektionen	2
1.1.2 Bakterielle Translokation als Ursache für die spontan bakterielle Peritonitis (SBP)	3
1.1.3 Klinische Aspekte und Risikofaktoren der SBP	5
1.2 Genetische Assoziationsstudien zur Identifizierung von Risikofaktoren für die Ausprägung einer SBP	7
1.2.1 Grundlagen genetischer Assoziationsstudien	7
1.2.2 Genotypisierungsmethoden	9
1.2.3 Genetische Risikofaktoren für eine SBP	12
1.3 Die Bedeutung von TRAF6 als Mediator zellulärer Immunsignale bei Monozyten und Makrophagen	17
1.3.1 Mechanismen der TRAF6 Protein-Protein-Interaktionen	17
1.3.2 Die Bedeutung von TRAF6 für die monozytäre Immunabwehr	20
1.3.3 Die Bedeutung von Polymorphismen im <i>TRAF6 Gen</i>	21
2 Fragestellungen und Ziele der eigenen Arbeit	22
3 Material	24
3.1 Geräte	24
3.2 Software	25
3.3 Verbrauchsmaterial	25
3.4 Zellkulturbedarf	26
3.5 Chemikalien	26
3.6 Kits	28
3.7 Western Blot Antikörper	29

3.8	Puffer und Lösungen	30
4	Methoden	31
4.1	Studiendesign	31
4.2	Patientendaten	32
4.3	Genotypisierung	34
4.3.1	DNA Extraktion aus EDTA-Vollblut	34
4.3.2	Genotypisierung für die Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) rs331457 und rs5030419 unter Verwendung der Schmelzkurvenanalyse mit FRET-Hybridisierungssonden	34
4.3.3	TaqMan Analyse für <i>TRAF6</i> SNP rs5030445	35
4.3.4	Validierung der <i>TRAF6</i> SNPs mittels Sequenzierung	35
4.3.5	TaqMan Analyse für <i>NOD2</i> - Genvarianten	36
4.4	Analyse monozytärer Primärzellen	37
4.4.1	Zellextraktion aus Patientenmaterial	37
4.4.2	Zellkultur und Stimulation mit LPS oder CpG	37
4.4.3	Genexpressionsanalyse	38
4.4.4	Analyse von <i>TRAF6</i> -Spleißvarianten	40
4.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	42
4.4.6	Western Blot und SDS-Page	42
4.4.7	Bestimmung aktiven NF-κBs	44
4.4.8	Bestimmung von Entzündungsmarkern in Blut, in Aszites und in Zellkulturüberständen monozytärer Zellen	44
4.5	Datenanalyse und statistische Auswertung	45
5	Ergebnisse	47
5.1	In-Silico Analyse zur Auswahl geeigneter <i>Tag</i> SNPs und zur Definition des <i>TRAF6</i> -Haplotyps	47
5.2	Reinheit der CD14 ⁺ -Zellen nach Zell-Separation mittels MACS	47
5.3	Studienpopulation und Beobachtungszeit	49
5.4	<i>TRAF6</i> -Haplotypen	51
5.5	<i>TRAF6</i> -Haplotypen und das Risiko einer spontan bakteriellen Peritonitis	53
5.5.1	<i>TRAF6</i> -Haplotyp und SBP-Risiko für Patienten ohne Hepatozelluläres Karzinom	56
5.5.2	<i>TRAF6</i> -Haplotyp und SBP-Risiko in Abhängigkeit der Ätiologie der Leberzirrhose	59

5.5.3	<i>TRAF6</i> -Haplotyp und SBP-Risiko in Abhängigkeit des <i>NOD2</i> -Genotyps	60
5.6	Klinische Präsentation der <i>TRAF6</i> -Haplotypen während der ersten SBP Episode	62
5.7	Funktionelle Konsequenzen des <i>TRAF6</i> -Haplotyps für die peritoneale und systemische Immunität	64
5.7.1	Die Assoziation des <i>TRAF6</i> -Haplotyps mit zirkulierenden Entzündungsmarker in Aszites und Blutserum unter nicht-inflammatorischen Bedingungen	65
5.7.2	Auswirkungen des <i>TRAF6</i> -Haplotyps auf den zellulären Immunstatus von Peritonealmakrophagen und Monozyten	65
5.7.3	Die ex-vivo Zellaktivierung ist nicht mit dem <i>TRAF6</i> -Haplotyp assoziiert	70
5.7.4	Die Bedeutung des <i>TRAF6</i> -Haplotyps für die <i>TRAF6</i> Expression in Peritonealmakrophagen und Monozyten	71
5.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
6	Diskussion	77
6.1	Studienkollektiv	77
6.2	Das kombiniert retro-und prospektive Studiendesign und seine Limitationen	78
6.3	Der <i>TRAF6</i> -Haplotyp ist signifikant mit dem Risiko für eine spontan bakterielle Peritonitis im Kontext einer hydropisch dekompensierten Leberzirrhose assoziiert	79
6.4	Die Bedeutung des <i>NOD2</i> -Genotyps für das <i>TRAF6</i> -Haplotyp assoziierte SBP-Risiko	81
6.5	Die Bedeutung des <i>TRAF6</i> -Haplotyps für den Verlauf der ersten SBP-Episode und das Überleben	83
6.6	Funktionelle Konsequenzen des <i>TRAF6</i> -Haplotyps für die systemische und peritoneale Immunität	84
6.7	Limitationen der Arbeit	88
6.7.1	Limitationen der klinischen Kohortenstudie	88
6.7.2	Limitationen der funktionellen Analysen	89
7	Schlussfolgerungen	92

Literaturverzeichnis	94
Abbildungsverzeichnis	108
Tabellenverzeichnis	109
Danksagung	110
Ehrenwörtliche Erklärung	111

Abkürzungsverzeichnis

× <i>g</i>	Erdbeschleunigung
95%-KI	95%-Konfidenzintervall
A20	Tumornekrosefaktor, Alpha-induziertes Protein 3, auch TNFAIP3
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
bactDNA	bakterielle DNA
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CAIDS	Leberzirrhose-assoziiertes Immundysfunktionssyndrom
CCL2	CC-Chemokinligand 2, auch MCP-1
CD	Differenzierungsantigene (engl.: <i>Cluster of differentiation</i>)
CD14 ⁺	CD14-positive Zellen
cDNA	komplementäre DNA
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
c-JUN	Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1
CpG-ODN	Oligodesoxynukleotide mit hohem Anteil von CpG-Motiven, d. h. Dinukleotiden aus Cytosin und Guanin
CRP	C-reaktives Protein
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ECSIT	<i>Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll Pathway</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	Extrazellulärsignal regulierte Kinase
ESBL	Extended-Spektrum Beta-Laktamasen Enterobacteriaceae
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (engl.: <i>Fluorescence activated cell sorting</i>)

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FXR	Farnesoid X Rezeptor
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HR	Hazard Ratio
HT	Haplotyp
HWE	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (E von engl. equilibrium)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INR	<i>International normalized ratio</i>
IQR	Interquartilabstand (engl. <i>Interquartile range</i>)
IRAK	<i>Interleukin-1 Receptor (IL-1R) associated kinase</i>
IRF	Interferon-regulierender Faktor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes-Protein
LD	<i>Linkage Disequilibrium</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i>
Lys63	Lysin in Position 63 der Aminosäuresequenz
mA	Milliampere
MACS	<i>Magnetic Cell Seperation</i>
MAF	Minor Allelfrequenz
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MAVS	<i>Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein</i>
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MDP	Muramyllopeptid
MEKK	<i>Mitogen-activated Protein kinase kinase kinase</i>
MELD	<i>Model for end-stage liver disease</i>
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)

MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation response gene D 88</i>
MΦ	Makrophagen
NDP52	Nuclear dot protein 52kDa
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligimerization domain-containing protein</i>
NR1H4	<i>Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4</i>
OR	Odds Ratio, auch Chancenverhältnis
<i>P</i>	P-Wert
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
Pam3CSK4	<i>Synthetic triacylated lipoprotein - TLR1/2 ligand</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMN	polymorphnukleäre Zellen
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PRR5L	<i>Proline rich 5 like protein</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid Membran
qRT-PCR	quantitative PCR der cDNA
RIG	<i>Retinoic acid-inducible gene</i>
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
RLR	<i>RIG-1 like receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SAAG	Serum-Aszites-Albumin-Gradient
SBP	Spontan bakterielle Peritonitis
sCD163	lösliches CD163

SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
suPAR	löslicher Urokinase-Plasminogen-Aktivator Rezeptor
TAB	TAK1 <i>binding Protein</i>
TAK	<i>Transforming Growth β-activated kinase</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCF7L2	<i>Transcription factor 7-like 2 gene</i>
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF	Transforming Growth Factor
TIR	Toll-Interleukin-1 Rezeptor
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFAIP3	Tumornekrosefaktor, Alpha-induziertes Protein 3, auch A20
TNFIP1	Tumornekrosefaktor, Alpha-induziertes Protein 1
TNFR	Tumornekrosefaktor Rezeptor
TRAF6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-assoziiertes Faktor 6
TRIF	<i>Toll/Interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducing interferon-beta</i>
Ubc13	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N</i>
Uev1A	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1</i>
UTR	untranslatierter Bereich (engl. <i>untranslated region</i>)
V	Volt
WBC	Leukozyten (engl. <i>white blood cells</i>)
ZnF	Zink-Finger Domäne

Zusammenfassung

Die spontan bakterielle Peritonitis (SBP) ist eine häufige und schwerwiegende infektiöse Komplikation bei Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose. Ausgelöst durch die pathologische bakterielle Translokation von Bakterien aus dem Darm in die systemische Zirkulation führt die SBP häufig zu Organversagen mit Todesfolge. Nach aktuellen Meta-Analysen beträgt die mediane Mortalität infolge einer SBP 33% nach einem Monat und 66% nach 12 Monaten. Antibiotika stellen derzeit die einzige Option zur Prophylaxe dar. Diese sind vor dem Hintergrund zunehmender Antibiotikaresistenzen Hochrisikopatienten vorbehalten. Geeignete Kriterien zur Identifizierung dieser Patienten sind neben klinischen Faktoren, wie einer gastrointestinalen Blutung oder einer fortgeschrittenen Leberinsuffizienz, unter anderem genetische Polymorphismen im *NOD2*, *TLR2*, *MCP1* und *NDP52* Gen. In diesem Kontext stellen Monozyten und residente Peritonealmakrophagen bedeutende Zellpopulationen für die Regulation und Kontrolle von Inflammation und Infektionen dar. Der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierte Faktor 6 (TRAF6) ist ein zentrales Molekül der *Pattern Recognition Rezeptor* (PRR)-vermittelten Signaltransduktion, vermittelt Endotoxintoleranz und spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung monozytärer Zellen und der Vermittlung deren antimikrobieller Aktivität. Aufgrund der zentralen Rolle von TRAF6 bei der Regulation der systemischen Inflammation und bakterieller Infektionen, wird in dieser Arbeit die Bedeutung genetischer Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im *TRAF6* Gen für das SBP-Risiko analysiert. Hierfür wurden 432 Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose in einer kombiniert retro- und prospektiven Assoziationsstudie untersucht. Zur Erfassung funktioneller Konsequenzen der genetischen Varianten wurden neben der statistischen Analyse von Patientendaten, *in vitro* Untersuchungen an Monozyten und Peritonealmakrophagen durchgeführt. Insbesondere die Expression der in der TRAF6-Signalkaskade involvierten Proteine, wie TRAF6, A20, TNFIP1, c-JUN, JNK, ERK und p38 sowie des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurden untersucht. Zusätzlich erfolgte die Analyse pro- und anti-inflammatorischer Zytokine, welche

infolge erfolgreicher intrazellulärer Signaltransduktion an die Zellumgebung abgegeben wurden und als Gradmaß der systemischen Inflammation dienten.

Die statistische Auswertung der 432 Patienten zeigte, dass der durch 2 SNPs definierte *TRAF6*-Haplotyp einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer SBP darstellt [Odds Ratio (OR): 1,95; 95%-Konfidenzintervall (KI): 1,22-3,12; P-Wert (P)=0,005]. Diese Assoziation konnte mit einer prospektiven Sensitivitätsanalyse und zusätzlich mit einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse unter Beachtung möglicher Drittvariablen bestätigt werden. Ein Viertel der untersuchten Patienten waren Träger des Risiko-*TRAF6*-Haplotyps 2. Damit handelte es sich um einen häufigen und bedeutsamen Risikofaktor für die Entwicklung einer SBP, der jedoch die Gesamtmortalität nicht signifikant beeinflusste. Träger des Risiko-*TRAF6*-Haplotyps 2 zeigten sogar tendenziell einen milderen inflammatorischen Verlauf der SBP, welcher sich als vorteilhaft für das kurzfristige Überleben erwies. 83% der Patienten mit dem Risiko-*TRAF6*-Haplotyp 2 lebten noch 28 Tage nach der Infektion, wohingegen bei der Vergleichsgruppe nur 59% die ersten 28 Tage überlebten (P =0,06). Dieser weniger inflammatorische Phänotyp konnte im sterilen, nicht-neutrozytischem Aszites bestätigt werden. So waren die Konzentration des löslichen Urokinase-Plasminogen-Aktivator Rezeptors (suPAR) im Aszites und die mRNA-Konzentrationen von *CXCL8* und *IL6* in Peritonealmakrophagen bei Trägern des Risiko-*TRAF6*-Haplotyps 2 signifikant geringer. Auch die *CXCL8*-Sekretion nach TLR-4-Stimulation von Peritonealmakrophagen war vermindert. Aufgrund hoher interindividueller Expressionsunterschiede ließ sich in humanen Primärzellen jedoch kein Zusammenhang zwischen den *TRAF6*-Haplotypen und der *TRAF6*-Expression oder NF- κ B-Aktivierung in Ruhe oder nach Stimulation nachweisen.

Der *TRAF6*-Haplotyp, in Zusammenschau mit anderen genetischen und phänotypischen Charakteristika, ist für eine differenzierte SBP-Risikostratifizierung geeignet. Erste Hinweise suggerieren einen Zusammenhang zwischen den *TRAF6*-Haplotypen und dem Ausmaß der peritonealen Immunaktivierung, weitere Untersuchungen zur Aufklärung des Pathomechanismus sind jedoch notwendig. Die Assoziation des *TRAF6*-Haplotyps mit dem inflammatorischen Phänotyp identifiziert *TRAF6* als ein interessantes Target für die Entwicklung antibiotikafreier, immunmodulatorischer Strategien zur Therapie und Prophylaxe der SBP.

1 Einleitung

In diesem Kapitel werden die grundlegenden Begriffe und Zusammenhänge erläutert, die für das Verständnis der folgenden Inhalte notwendig sind. Dazu wird ausgehend von den klinischen Aspekten der Leberzirrhose (1.1, S.1) über die Pathomechanismen und Risikofaktoren der spontan bakteriellen Peritonitis die Bedeutung von TRAF6 für das angeborene Immunsystems und die Auswirkungen genetischer Modifikationen dessen dargestellt (1.2, S.7 und 1.3, S.17).

1.1 Klinische Aspekte der Leberzirrhose mit spontan bakterieller Peritonitis

Weltweit stellen Lebererkrankungen ein erhebliches Gesundheitsproblem dar. 29 Millionen Menschen litten 2010 allein in der Europäischen Union an einer chronischen Lebererkrankung (Blachier et al. 2013), die unbehandelt in vielen Fällen zur Leberzirrhose führt. Die Morbidität und Mortalität der Leberzirrhose sind groß. Jährlich sterben eine Million Menschen weltweit, davon 170.000 Europäer, infolge einer Leberzirrhose. Das entspricht etwa 2% aller Todesfälle weltweit. (Blachier et al. 2013, Mokdad et al. 2014, Bruns 2018).

Die Leberzirrhose ist durch einen fortschreitenden Vernarbungsprozess des Lebergewebes infolge chronischer Schädigung, immunologisch, metabolisch oder viral bedingt, gekennzeichnet. Etwa die Hälfte aller neu diagnostizierten Leberzirrhose-Fälle, zeigen bereits Zeichen der Dekompensation, wie Aszites, gastrointestinale Blutung, Enzephalopathie oder Ikterus. Die Prognose für Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose ist mit einer 1-Jahres-Überlebensrate von 60% und einer 2-Jahres-Überlebensrate von 45% deutlich schlechter als bei Patienten mit kompensierter Leberzirrhose mit 95% und 90% Überlebenswahrscheinlichkeit (D'Amico et al. 2006). Eine kurative Therapie der dekompensierten Leberzirrhose, neben der Lebertransplantation, existiert bisher nicht (Schuppan und Afdhal 2008). Daher gilt es das Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen und vor allem schwerwiegende Komplikationen zu vermeiden, umso die Lebensqualität zu erhalten und die Chancen auf ein Spenderorgan zu vergrößern (Reddy et al. 2015). Insbesondere Infektionen stellen eine große Gefahr für Patienten mit

dekompensierter Leberzirrhose dar. Etwa ein Drittel der hospitalisierten Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose zeigen bei Aufnahme, beziehungsweise entwickeln während ihres Aufenthaltes im Krankenhaus eine bakterielle Infektion. (Caly and Strauss 1993, Borzio et al. 2001). 20-30% dieser Patienten weisen eine spontan bakterielle Peritonitis (SBP) auf, welche neben tiefen Atemwegsinfektionen, Bakteriämie und *Clostridium difficile*-Infektionen mit der höchsten Mortalität verbunden ist (Arvaniti et al. 2010, Bajaj et al. 2010, Fernández et al. 2017).

1.1.1 Leberzirrhose und Infektionen

Die Prävalenz bakterieller Infektionen bei hospitalisierten Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose wurde in zahlreichen Studien untersucht und liegt zwischen 34 und 47% (Caly und Strauss 1993, Borzio et al. 2001, Sargenti et al. 2015). Dies ist deutlich höher als die Gesamtrate nosokomialer Infektionen in europäischen Akutkrankenhäusern mit 6% (ECDC 2013). Zudem erhöht eine Infektion die Mortalität bei Leberzirrhose um das 4-fache (Arvaniti et al. 2010).

Die Ursachen für die Infektionsanfälligkeit bei Leberzirrhose sind vielfältig und werden unter dem Begriff des Leberzirrhose-assoziierten Immundysfunktions-syndrom (CAIDS) zusammengefasst (Albillos et al. 2014). Durch den strukturellen Umbau des Lebergewebes kommt es zur Schädigung der Kupffer-Zellen, den Makrophagen der Lebersinusoide. Diese Makrophagen sind maßgeblich für die Wahrnehmung der Immunfunktion der Leber verantwortlich. So erfolgt hier bei einer gesunden Leber die immunologische Auseinandersetzung mit, und die Elimination von Pathogenen, Endotoxinen, wie auch Zytokinen aus dem Blut. Bei der Leberzirrhose ist diese Blutreinigungsfunktion eingeschränkt und wird im Falle von portalen Umgehungskreisläufen bei fortgeschrittener Leberschädigung umgangen. Das hat eine stetige systemische Immunaktivierung zur Folge. (Bonnell et al. 2011). Zusätzlich dazu aktivieren *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs), freigesetzt durch die Nekrose der Leberzellen, die zirkulierenden Immunzellen. Das führt zu erhöhten Serumkonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine, insbesondere des Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und des Interleukin-6 (IL-6). Weiterhin ist die Homöostase im Darm bei fortgeschrittener Leberzirrhose vielfältig gestört, was zu einer erhöhten Darmpermeabilität führt. (Albillos et al. 2014).

Diese ungünstige Konstellation aus der Leberschädigung und der erhöhten Darmpermeabilität führt zu einer chronischen systemischen Inflammation bei Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose. Häufig erschöpft sich die Immunaktivierung mit dem Fortschreiten der Erkrankung und schlägt in eine Immundefizienz um. Dies macht deutlich, wie groß und dynamisch das Spektrum des Leberzirrhose-assoziierten Immundysfunktionssyndroms ist. (Albillos et al. 2014).

1.1.2 Bakterielle Translokation als Ursache für die spontan bakterielle Peritonitis (SBP)

Der Übertritt enteraler Bakterien aus dem Darmlumen in mesenteriale Lymphknoten, die Leber und die systemische Zirkulation wird als bakterielle Translokation bezeichnet. Es handelt sich dabei um einen physiologischen Prozess, welcher bei Gesunden durch das darmassoziierte Immunsystem kontrolliert wird. (Wiest et al. 2014). Bei Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose ist dieses feinregulierte System durch eine ungünstige Kombination aus mikrobiologischer Fehlbesiedlung des Darmes und einer erhöhten Darmpermeabilität gestört (Bruns et al. 2016b). So konnten kultivierbare enterale Mikroorganismen in 30% intraoperativ entnommener mesenterialer Lymphknoten von Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu waren diese Mikroorganismen in nur 9-15% der Patienten ohne Leberzirrhose nachweisbar. (O'Boyle et al. 1998, Cirera et al. 2001). Für Patienten mit Leberzirrhose konnte gezeigt werden, dass ihre Paneth-Zellen weniger antimikrobielle Peptide sekretieren (Teltschik et al. 2012), dass sie weniger intestinale *Tight Junction*-Proteine besitzen (Assimakopoulos et al. 2012) und dass die oral-fäkale Transitzeit erhöht ist (Gunnarsdottir et al. 2003). Zudem kommt es durch die portale Hypertension zu einem portal-venösen Rückstau des Blutes zum Darm, was zu einer ödematösen Schwellung der Darmwand und damit einer Durchblutungsstörung im Darm führt. Diese Faktoren führen zu einer erhöhten Permeabilität des Darmes und fördern dadurch die pathologische bakterielle Translokation. Immunzellen, wie dendritische Zellen, Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten, werden durch den dauerhaften Kontakt mit lebenden Bakterien und/oder deren Produkten, *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), aktiviert. Infolge dessen sezernieren sie pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- α ,

IL-6 und Interferon- γ (IFN- γ). Diese Zytokine erhöhen ihrerseits die Darmpermeabilität und fördern zusätzlich die Translokation lebender Bakterien (Bruewer et al. 2003, Suzuki et al. 2011, Clark et al. 2005). Es handelt sich also um einen sich selbst erhaltenden und verstärkenden Kreislauf aus Immunstimulation, Steigerung der Darmpermeabilität und verstärkter Immunaktivierung (Abbildung 1).

Die pathologische bakterielle Translokation wird daher durch die kontinuierliche, vermutlich parazelluläre Translokation von PAMPs in der Frühphase gefolgt von der Transzytose lebender Bakterien in der Spätphase beschrieben. (Wiest et al. 2014).

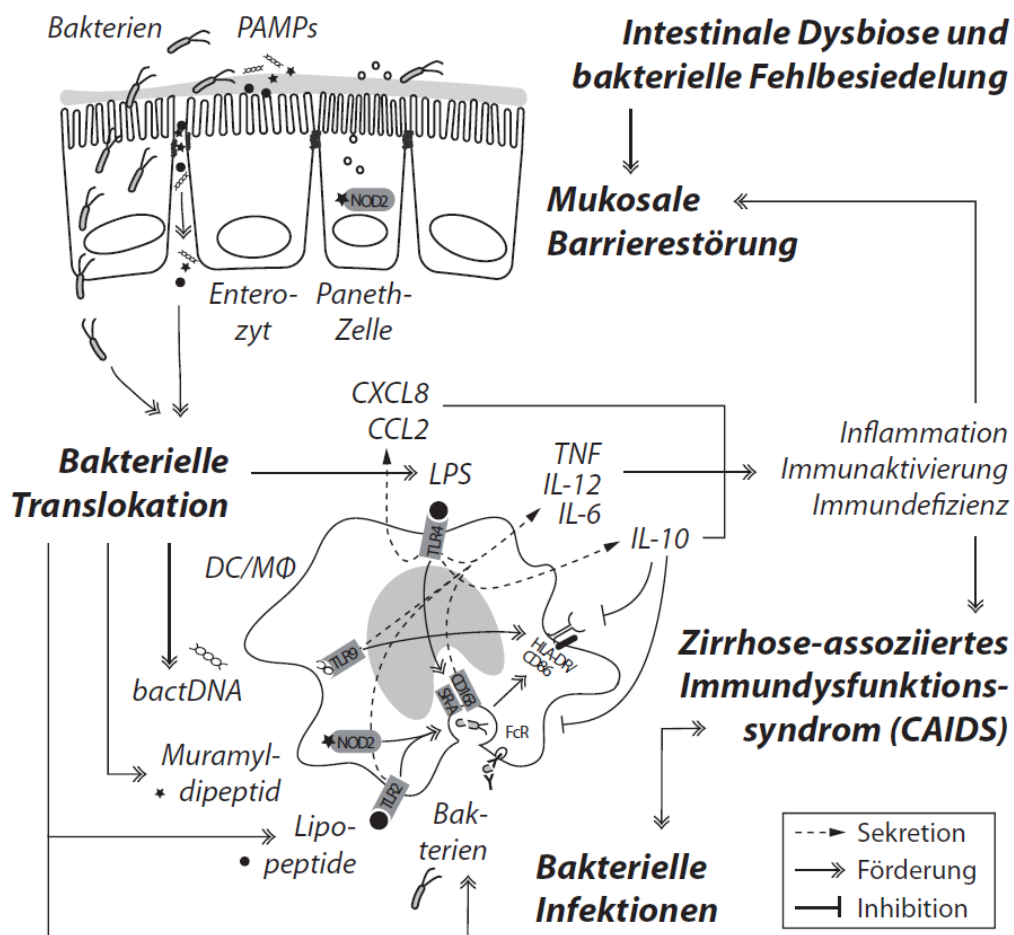


Abbildung 1: Ursachen und Folgen der pathologisch bakteriellen Translokation bei dekompenzierter Leberzirrhose aus Bruns (2018).

Abkürzungen und Erläuterungen: im Text; bakterielle DNA (bactDNA); dendritische Zellen (DC); Makrophagen (MΦ).

1.1.3 Klinische Aspekte und Risikofaktoren der SBP

Die bakterielle Translokation gilt als wesentliche Ursache für die SBP. Diese kann sowohl asymptomatisch verlaufen oder von folgenden klinischen Symptomen begleitet sein (Ginès et al. 2010):

- (1) Zeichen der Peritonitis: abdominale Druckempfindlichkeit, abdominale Schmerzen, Erbrechen, Diarrhoe oder Ileus
- (2) Zeichen der systemischen Inflammation: Hyper- oder Hypothermie, Schüttelfrost, veränderte Leukozytenkonzentration im Blut, Tachykardie und/oder Tachypnoe;
- (3) Verschlechterung der Leberfunktion
- (4) hepatische Enzephalopathie
- (5) Schock
- (6) Nierenversagen
- (7) Gastrointestinale Blutungen.

Die große Varianz des klinischen Phänotyps und mögliche asymptomatische Verläufe einer SBP erschweren eine zuverlässige Diagnosestellung. Der bisher einzige zuverlässige Parameter zur Diagnostik ist die Konzentration polymorphnukleärer Zellen (PMN), neutrophiler Granulozyten, im Aszites. Bei ≥ 250 neutrophilen Granulozyten (PMN) pro mm^3 Aszites gilt die Diagnose einer SBP als gesichert, insofern andere abdominelle Infektionsherde (z. B. Hohlorganperforation, Cholezystitis, Divertikulitis, etc.), Peritonealmetastasen oder Tuberkulose ausgeschlossen werden konnten (Gerbes et al. 2011). Obwohl die bakterielle Translokation als Ursache der SBP gesehen wird, können in mehr als 40% der SBP-Fälle mikrobiologisch-kulturell keine Bakterien nachgewiesen werden (Gerbes et al. 2011). Ebenso gibt es Fälle, die eine Kolonisation des Aszites mit Bakterien aufweisen, ohne dass es zu einer inflammatorischen Reaktion im Peritonealraum mit erhöhter Konzentration neutrophiler Granulozyten kommt. Dieser sogenannte monomikrobielle Bakteraszites wird als erster Schritt in der Entwicklung einer SBP verstanden (Rimola et al. 2000).

Die frühzeitige Erkennung und Therapie der Infektion ist für das Überleben der Patienten von enormer Wichtigkeit, denn die SBP geht mit der höchsten Mortalität bei Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose einher. Eine Metaanalyse von 101 Studien aus den Jahren 1978-2009 mit Daten zur Mortalität der SBP von Arvaniti et

al. (2010) ergab eine mediane Mortalität von 32,5% innerhalb eines Monats und 66,2% innerhalb eines Jahres nach der Infektion.

In einer Studie von Ginés et al. (1990) lag die Rezidiv-Rate für eine weitere SBP innerhalb eines Jahres nach der 1. Episode bei 68% und konnte durch eine antibiotische Sekundärprophylaxe mit Norfloxacin auf 20% gesenkt werden. Ebenso konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine antibiotische Primärprophylaxe zur Reduzierung von SBP-Episoden beiträgt (Fernández et al. 2007, Loomba et al. 2009). In einer Meta-Analyse mit insgesamt 647 Patienten, aus 8 Studien zur oralen antibiotischen Prophylaxe der SBP, zeigte sich eine um 72% geringere Mortalität nach 3 Monaten (Saab et al. 2009). Fernández et al. (2012) zeigten in ihrer Studie jedoch, dass eine langandauernde antibiotische Primärprophylaxe zu einer veränderten Darmflora mit multiresistenten Erregern führt. Zudem war die Wirksamkeit der Primärprophylaxe der SBP mit nur 26% sehr gering. Bei Patienten, welche trotz Primärprophylaxe eine SBP entwickelten, ließen sich vermehrt multiresistente Bakterien nachweisen, wie *Extended-Spektrum Beta-Laktamasen Enterobacteriaceae* (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa*, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) und *Enterococcus faecium*. Zudem ging die durch multiresistente Bakterien bedingte SBP mit einer signifikant höheren Mortalität einher (25% versus 12%; $P=0,001$).

Vor diesem Hintergrund und in Anbetracht zunehmender Antibiotikaresistenzen lässt sich eine antibiotische Primärprophylaxe für alle Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose nicht rechtfertigen. Aktuelle Empfehlungen nach ist die SBP-Prophylaxe Hochrisikopatienten vorbehalten, d.h. Patienten mit: gastrointestinaler Blutung, vorausgegangener SBP, eingeschränkter Nierenfunktion oder fortgeschrittener Leberinsuffizienz (Gerbes et al. 2011).

Die schwerwiegenden Folgen der SBP, die eingeschränkten Prophylaxe- und Therapiemöglichkeiten, sowie der Wunsch, das individuelle SBP-Risiko der Patienten abschätzen zu können, haben zu zahlreichen Forschungsarbeiten geführt, die phänotypische, umweltassoziierte und genetische Risikofaktoren für die SBP identifizieren konnten. Dazu zählen Marker einer fortgeschrittenen Lebererkrankung und portalen Hypertension, wie eine erhöhte Serumkonzentration von Bilirubin, eine geringe Thrombozytenkonzentration, eine Konzentration von ≥ 100 Neutrophilen/mm³ Aszites, Hyponatriämie, sowie das Auftreten einer

gastrointestinalen Blutung (Bruns et al. 2014, Schwabl et al. 2015). Zudem stehen Protonenpumpeninhibitoren im Verdacht die Entwicklung einer SBP zu fördern (Goel et al. 2012, Ratelle et al. 2014).

1.2 Genetische Assoziationsstudien zur Identifizierung von Risikofaktoren für die Ausprägung einer SBP

In diesem Kapitel werden grundlegende Begriffe und Zusammenhänge erläutert, die für das Verständnis genetischer Assoziationsstudien notwendig sind (1.2.1, S. 7). Genotypisierungsmethoden (1.2.2, S.9) werden erklärt und abschließend werden die genetischen Risikofaktoren der SBP mit Hinblick auf die zugrundeliegenden Pathomechanismen dargestellt (1.2.3, S.12).

1.2.1 Grundlagen genetischer Assoziationsstudien

Genetische Risikofaktoren die mit komplexen Erkrankungen, wie beispielsweise der SBP, assoziiert sind, können auf verschiedenen Wegen identifiziert werden. **GENOMWEITE ASSOZIATIONSSTUDIEN** (GWAS) nutzen Hochdurchsatz-Genotypisierungsmethoden, bei denen Hunderttausende Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) analysiert werden und statistisch auf ihren Zusammenhang mit Erkrankungen, getestet werden (Christensen und Murray 2007). Dem gegenüber stehen die **KANDIDATENGEN-ASSOZIATIONSSTUDIEN**. Bei diesen werden Polymorphismen ausgewählter Gene untersucht, die für die Ätiologie der Erkrankung von funktioneller Bedeutung sein könnten. Voraussetzung für einen solchen Hypothesen-basierten Ansatz ist das Verständnis über die zu Grunde liegenden Pathomechanismen der Krankheit. (Tabor et al. 2002).

Ein **POLYMORPHISMUS** ist eine Variation in der DNA-Sequenz, welche durch Mutation entstanden ist. In Abgrenzung zur Mutation beträgt die **MINOR ALLELFREQUENZ (MAF)** eines Polymorphismus mindestens 1% oder mehr innerhalb einer Population. Im humanen Genom finden sich verschiedene Typen von Polymorphismen: **EINZELNUKLEOTID-POLYMORPHISMEN (SNPs)**, *Repeat*-Polymorphismen, Insertionen und Deletionen von einzelnen Basenpaaren oder größeren Sequenzabschnitten (Tabor et al. 2002). Die häufigste Form der Sequenzvariation im humanen Genom stellt der SNP dar. SNPs sind einzelne DNA-Basen einer bestimmten genomischen DNA-Position, mit verschiedenen Sequenzalternativen (**ALLELE**) bei den normalen Individuen einer Population. Das

seltener vertretene Allel (**MINOR ALLEL**) in dieser Population wird als SNP verstanden. (Brookes 1999).

SNPs können vielfältige Auswirkungen haben. Liegt der SNP im kodierenden Bereich der DNA, so muss zwischen synonyme und nicht-synonyme Mutation unterschieden werden. Im Fall einer **SYNONYMEN MUTATION** ändert sich zwar die Basenfolge der DNA, nicht aber die Aminosäuresequenz des Proteins (degenerativer genetischer Code). Bei einer **NICHT-SYNONYMEN MUTATION** verändern sich der genetische Code und damit die Aminosäuresequenz des Proteins. Dies kann zu einer veränderten Proteinfunktion (*Missense Mutation*) bis hin zum vollständigen Funktionsverlust (*Nonsense Mutation*) führen. SNPs in nicht-kodierenden DNA-Bereichen, wie in Introns oder in intergenischen Bereichen, verlaufen ebenso nicht ohne Konsequenzen für den Organismus. Dazu zählen:

- (1) Veränderungen bei der Transkription der Gene, durch SNPs in transkriptionsregulierenden Strukturen, wie Promotoren, *Enhancern* oder *Silencern*
- (2) Veränderungen der mRNA-Stabilität, durch SNPs in regulierenden Bereichen der prä-mRNA Prozessierung, d.h. im 3'-untranslatierten Bereich (UTR), 5'-UTR oder in Spleißregionen
- (3) Veränderungen der Sekundärstruktur der DNA. (Tabor et al. 2002).

Die Gesamtheit der Variationen im humanen Genom einer Population hat durch Mutation und Rekombination kontinuierlich zugenommen. Wobei durch Mutation eine neue DNA-Sequenz innerhalb einer Vererbungslinie entsteht und durch Rekombination die bestehenden DNA-Sequenzen der elterlichen Chromosomen in den Chromosomen der Tochtergeneration neu kombiniert werden. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit für die Trennung zweier Variationen einer DNA-Sequenz abhängig von der Distanz zwischen den beiden betroffenen Positionen. Extrem nahe Loci werden meist gemeinsam vererbt (*linked*). Mit zunehmender Distanz der Loci steigt die Wahrscheinlichkeit für eine unabhängige Vererbung (*unlinked*), beispielsweise für Loci die an den jeweilig entgegengesetzten Enden von Chromosomen liegen oder gar auf verschiedenen Chromosomen. Das **LINKAGE KONZEPT** bezieht sich auf die Tatsache, dass zwei Loci in einer Generation gemeinsam vererbt werden. Auf Populationsebene wird das Maß der Korrelation zwischen verschiedenen Loci durch das Konzept des **LINKAGE DISEQUILIBRIUM (LD)**

beschrieben. Korrelieren die Allele zweier Loci innerhalb einer Population, so wird angenommen, dass diese gemeinsam vererbt werden und nicht durch Rekombination während der Meiose getrennt werden. (Barrett 2011). Ein **HAPLOTYP** (auch LD-Block) beschreibt eine spezielle Kombination von zwei oder mehreren Allelen einer Population, welche gemeinsam vererbt werden, das heißt welche sich in starkem LD zueinander befinden (Gabriel et al. 2002). Ein **TAGSNP** steht repräsentativ für alle Allele eines Haplotyps. Um eine Assoziation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp zu untersuchen, müssen daher nicht alle SNPs einer Region analysiert werden, sondern es genügt die Genotypisierung eines TagSNPs, der im LD mit dem funktionellen Allel liegt. In diesem Fall spricht man von einer indirekten Assoziation. (Carlson et al. 2004).

Bei einer genetischen Assoziationsstudie erfolgt eine Momentaufnahme der untersuchten Population hinsichtlich des Genpools. Daher wird angenommen, dass der Einfluss evolutionärer Faktoren, wie Migration, Mutation, Selektion, Gendrift oder das Fehlen zufälliger Paarung, auf die Allelfrequenz der Population vernachlässigbar ist und das **HARDY-WEINBERG-GLEICHGEWICHT (HWE)** besteht (Zintzaras und Lau 2008). Bei Vorliegen des HWE kann die Verteilung der Genotyphäufigkeiten allein aus der Allelfrequenz der Population abgeleitet werden. Für zwei Allele P und Q mit den Allelfrequenzen p und q ergibt sich folgender Zusammenhang: $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$, wobei p^2 die Frequenz der Homozygoten mit dem Allel P , q^2 die Frequenz der Homozygoten mit dem Allel Q und $2pq$ die Frequenz der Heterozygoten mit den Allelen P und Q darstellt.

Abweichungen vom HWE in genetischen Assoziationsstudien können durch fehlerhafte Genotypisierung, die Populationsstruktur oder Selektionsbias bei der Rekrutierung begründet sein. Daher wird die Überprüfung der Studienpopulation auf Konformität mit dem HWE zur Qualitätskontrolle empfohlen. In der Fallgruppe hingegen können Abweichungen vom HWE für den krankheitsassoziierten Genlocus erwartet werden. (Zintzaras and Lau 2008).

1.2.2 Genotypisierungsmethoden

Für die Identifizierung von Polymorphismen stehen heute weit mehr als 100 Genotypisierungsverfahren zur Verfügung. Diese lassen sich nach ihren Detektionsprinzipien unterteilen (Wilhelm 2003, Rapley und Harbron 2012). Dazu zählen: Sequenzierungsbasierte Methoden, Methoden die Mobilitätsunterschiede

doppelsträngiger DNA-Fragmente mit Basenfehlpaarungen in elektrophoretischen und chromatographischen Trennverfahren nutzen (denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE), temperaturmodulierte Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (TmHPLC)), Hybridisierungsbasierte Methoden (SNP-Microarrays, dynamische Allel-spezifische Hybridisierung (DASH)) und *Realtime*-PCR basierte Methoden (Wilhelm 2003, Rapley and Harbron 2012).

In dieser Arbeit wurden die *Realtime*-PCR basierte Schmelzkurvenanalyse mit Hybridisierungssonden und die *Realtime*-PCR gekoppelte Analyse mit TaqMan-Sonden verwendet. Beide Methoden nutzen den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), einen von Theodor Förster 1948 beschriebenen strahlungsfreien Energietransfer zwischen einem Donor- und Akzeptorchromophor (Förster 1948). Dieser Energietransfer ist jedoch nur bei ausreichender räumlicher Nähe (<10 nm Distanz) zwischen beiden Chromophoren möglich.

Bei der **Schmelzkurvenanalyse mit FRET-Hybridisierungssonden** werden zwei verschiedene, entweder mit dem Donor- (hier Fluorescein) oder dem Akzeptorfluorophor (hier LC610) gekoppelte DNA-Oligonukleotide verwendet, die unmittelbar nebeneinander an die zu untersuchende Ziel-DNA hybridisieren. Dadurch kommt es zum FRET und das vom Akzeptorfluorophor emittierte Fluoreszenzsignal wird detektiert. Durch die zunehmende Erhöhung der Temperatur bei der Schmelzkurvenanalyse trennen sich die Hybridisierungssonden von der Ziel-DNA und der FRET zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor wird unterbrochen. Mit steigender Temperatur nimmt daher das detektierbare Fluoreszenzsignal des Akzeptorfluorophores ab (Abbildung 2, S. 11) Sonden, deren Sequenz sich von der Ziel-DNA unterscheiden, dissoziieren aufgrund ihrer niedrigeren Schmelztemperatur zeitiger als Sonden, welche exakt komplementär sind. Somit lassen sich bereits Abweichungen einzelner Basen nachweisen und die Allelsituation (Homozygot Wildtyp / Heterozygot / Heterozygot Mutant) der SNPs bestimmen. Dafür müssen die Sonden so konstruiert sein, dass eine Sonde an eine DNA-Sequenz bindet, welche sowohl Wildtyp als auch Mutante aufweisen (Anchor), und die zweite Sonde (Sensor) so, dass sie die Mutationsstelle (hier SNP) überspannt. Weist die Sensor-Sonde die Wildtypsequenz auf, so dissoziiert diese bei der Schmelzkurvenanalyse zuerst von mutierten Amplifikaten und später, infolge der stärkeren Bindungsenergie, bei höheren Schmelztemperaturen von den

Wildtyp-Amplifikaten. Bei Heterozygoten nimmt die Fluoreszenz in zwei Schritten ab, da ein Allel die Wildtypsequenz und das andere die mutierte Sequenz aufweist. (Bernard et al. 1998).

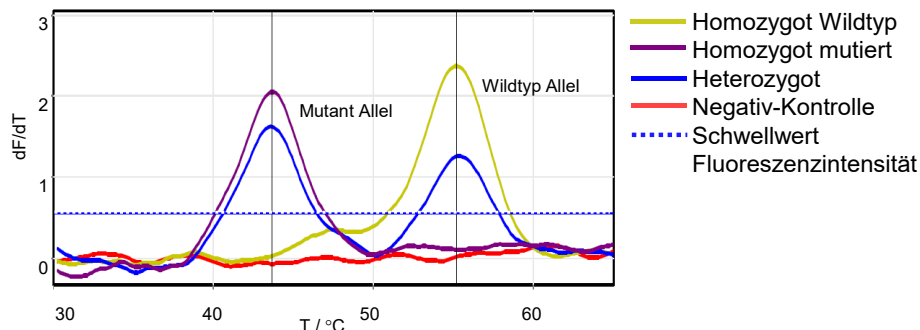


Abbildung 2: Schmelzkurvenanalyse mit FRET-Hybridisierungssonden zur Diskriminierung der Allelsituation des TRAF6 SNP rs5030419. Aufgetragen ist der Betrag der 1. Ableitung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur. Löst sich die Sensorsonde von dem Amplifikat so erlischt das Fluoreszenzsignal des Akzeptorfluorophores und die Fluoreszenzintensität nimmt ab. Die Sensorsonde dissoziiert bei 43°C für das mutierte Allel und bei 55°C für das Wildtyp Allel. Da Heterozygote Träger beider Allele sind, nimmt die Fluoreszenzintensität in 2 Stufen ab.

Die **SNP Genotypisierung mit TaqMan-Sonden** erfolgt parallel während der *Realtime*-PCR. TaqMan-Sonden sind allel-spezifische DNA-Oligonukleotide, die an ihrem 5'-Ende mit Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Donorfluorophor) und am 3'-Ende mit einem *Quencher* (Akzeptor) gekoppelt sind. Im Gegensatz zu der Schmelzkurvenanalyse mit Hybridisierungssonden führt der FRET zwischen Reporter und *Quencher* nicht zu einem Fluoreszenzsignal, sondern der *Quencher* löscht durch den FRET das Fluoreszenzsignal des Reporters aus. Für die SNP-Analyse mit TaqMan-Sonden werden immer 2 TaqMan-Sonden gleichzeitig verwendet, die sich nur am SNP-Locus in ihrer Sequenz unterscheiden und mit verschiedenen Reporter-Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Während der PCR bindet die allel-spezifische TaqMan-Sonde an die komplementäre Sequenz und wird während der Elongation durch die 5'-3'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut. Somit werden das Reporter-Fluorophor und Quencher räumlich voneinander getrennt, der FRET abgebrochen und das Fluoreszenzsignal des Reporter-Fluorophores kann detektiert werden. Dabei zeigen Homozygote nur für ein Reporterfluorophor, entweder der Wildtyp- oder der Mutant-TaqMan-Sonde ein Signal und Heterozygote zeigen die Signale für beide Reporterfluorophore, da sie je ein Wildtyp und ein mutiertes Allel tragen. (Rapley und Harbron 2012).

1.2.3 Genetische Risikofaktoren für eine SBP

Die hohe Rezidiv-Rate von 68% innerhalb eines Jahres nach einer ersten SBP-Episode (Ginés et al. 1990) weist auf eine individuelle genetische Prädisposition für eine SBP bei fortgeschrittener Lebererkrankung hin. So konnten verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) mit dem SBP-Risiko assoziiert werden. Es handelt sich um Gene, deren Proteine im Rahmen der angeborenen Immunabwehr in Signalkaskaden der *Pattern Recognition Receptors* (PRR) agieren:

- (1) *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2* (NOD2) (Appenrodt et al. 2010, Bruns et al. 2012a, Dinya et al. 2018)
- (2) *Toll-like Receptor 2* (TLR2) (Nischalke et al. 2011, Bruns et al. 2012b)
- (3) *Nuclear dot protein 52kDa* (NDP52) (Lutz et al. 2015)
- (4) *Monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) (Gäbele et al. 2009)
- (5) *Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4* (NR1H4) (Lutz et al. 2014).

1.2.3.1 Pathomechanismen der NOD2 Polymorphismen als Rationale für die Assoziation mit dem SBP-Risiko

NOD2 ist ein cytosolischer PRR zur Erkennung von Muramyl-dipeptid (MDP), ein Zellwandbestandteil Gram-positiver und -negativer Bakterien. NOD2 wird konstitutiv von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert. Dazu zählen neben Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophilen auch die Paneth-Zellen in den Dünndarmkrypten (Eckmann und Karin 2005). Die Rezeptoraktivierung erfolgt durch Interaktion von MDP mit der *Leucine-rich Repeat* (LRR) Domäne des NOD2 Proteins. Das führt über die Interaktion mit dem *Receptor Interacting Protein 2* (RIP2) zur der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Dadurch kommt es zur Transkription pro-inflammatorischer Gene, wie der Zytokine *TNF*, *IL6* und *CXCL8*. Darüber hinaus ist NOD2 in der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und Autophagie involviert (Negroni et al. 2018). *NOD2* SNPs, die innerhalb bzw. in unmittelbarer Nähe der LRR-Domäne liegen, wurden 2001 erstmalig in zwei großen GWAS mit Morbus Crohn, einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED) assoziiert (Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001). Bei den *NOD2* SNPs (Referenzsequenz: GRCh38p7) NC_000016.10(*NOD2*):g.50712015C>T(rs2066844) und NC_000016.10(*NOD2*):g.50722629G>C(rs2066845) handelt es sich um *Missense* Punktmutationen, die zu

einer veränderten Aminosäuresequenz im NOD2 Protein führen. Der *NOD2* SNP NC_000016.10(*NOD2*):g.50729867_50729868insC(rs2066847) beschreibt die Insertion eines Cysteins. Diese Insertion resultiert in einem veränderten Leseraster, bei dem ein vorzeitiges Stopcodon entsteht. Das mutierte NOD2 Protein ist infolge dessen um 33 Aminosäuren in der LRR-Domäne verkürzt. (Negroni et al. 2018). Die funktionellen Auswirkungen der *NOD2* SNPs sind bis heute nicht aufgeklärt und werden kontrovers diskutiert. So gibt es sowohl Hinweise auf eine verstärkte NOD2 Proteinfunktion als auch Hinweise auf einen Funktionsverlust, dessen Ursache in einer verminderten Pathogenerkennung durch die Strukturänderung in der LRR-Domäne gesehen wird. (Eckmann and Karin 2005, Fritz et al. 2010). Ergänzend dazu besteht ein Disput über den Zusammenhang der α -Defensin Expression in Paneth-Zellen mit den *NOD2* SNPs (Fritz et al. 2010). So konnten Wehkamp et al. (2004) eine verminderte α -Defensin Expression mit *NOD2* SNPs assoziieren. Dieser Assoziation widerspricht Simms et al. (2008) und führt die verminderte α -Defensin Expression auf einen Verlust von Paneth-Zellen infolge der Inflammation zurück.

Die starken Assoziationen der *NOD2* SNPs mit der gestörten Darmimmunität bei Morbus Crohn, lassen vermuten, dass diese SNPs potentielle Risikofaktoren für eine SBP im Kontext einer hydropisch dekompensierten Leberzirrhose darstellen. Denn eine gestörte Darmimmunität und die damit verbundene pathologische bakterielle Translokation werden als Ursache der SBP angesehen (Wiest et al. 2014). So konnten Appenrodt et al. 2010 erstmalig eine Assoziation dieser *NOD2* SNPs mit dem SBP-Risiko in einer Studie mit 150 Patienten nachweisen (OR: 3,06; 95%-KI: 1,31-7,15; $P=0,008$). Spätere Replikationsstudien konnten diese Assoziation jedoch nicht mehr adäquat bestätigen (siehe Diskussion 6.4 S. 81).

1.2.3.2 Pathomechanismen der *Toll-like Receptor 2* (TLR-2) Polymorphismen als Rationale für die Assoziation mit dem SBP-Risiko

Der *Toll-like Receptor 2* (TLR-2) ist ein membranständiger PRR von Immunzellen wie z.B. Monozyten und Makrophagen und wird zudem von immunkompetenten Gewebezellen wie z.B. der Lunge und des Darmes exprimiert. Er dient der Erkennung verschiedener PAMPs Gram-positiver und -negativer Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren. Die Rezeptoraktivierung resultiert in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der dadurch ausgelösten pro-inflammatorischen

Immunantwort mit verstärkter Bildung von TNF- α , IL-6 und CXCL8. (Kawai und Akira 2010, Hamonic et al. 2018). Polymorphismen im *TLR2* Gen werden mit infektiösen und inflammatorischen Erkrankungen wie Tuberkulose, Lyme-Borreliose, Sarkoidose und Sepsis assoziiert (Noreen and Arshad 2015).

Darunter finden sich auch der SNP (Referenzsequenz: GRCh38p7) NC_00004.12(*TLR2*):g153685974T>A(rs4696480) der Promotorregion und der Guanin-Thymin (GT) *Repeat* Microsatelliten Polymorphismus des Intron 2, welche zueinander im *Linkage* liegen und von Nischalke et al. (2011) mit dem SBP-Risiko assoziiert werden konnten (N = 150; rs4696480: OR: 3,46; 95%-KI: 1,58-7,57; $P=0,002$ und GT Repeat Microsatellit: OR:3,41; 95%-KI: 1,68-6,93; $P=0,001$). Bruns et al. (2012b) konnten die Assoziation mit rs4696480 nicht bestätigen (N = 119; $P=0,49$), zeigten dafür aber eine Assoziation der SBP mit dem SNP NC_00004.12(*TLR2*):g.153705165G>A(rs5743708) (N = 119; $P=0,019$; Die Berechnung von OR und 95%-KI war aufgrund nicht publizierter absoluter Daten nicht möglich.), welcher zuvor bei Nischalke et al. (2011) ebenfalls zu einer Assoziation mit der SBP tendierte ($P=0,09$; Die Berechnung von OR und 95%-KI war aufgrund nicht publizierter Daten nicht möglich.). Bei diesem SNP handelt es sich um eine *Missense*-Mutation, die an Position 753 des TLR-2 Proteins Glutamin anstelle von Arginin enthält. Darüber hinaus war das SBP-Risiko bei Trägern des *TLR2* (GT) *Repeat* Microsatelliten Polymorphismus des Intron 2 und einer *NOD2*-Risikovariante am größten (OR: 11,3; 95%-KI: 3,32–37,65; $P=0,00002$).

Studien über die funktionellen Auswirkungen der *TLR2* Polymorphismen sowie das funktionelle Zusammenwirken von TLR-2 und NOD2 fehlen weitgehend. Der *TLR2* Promotorpolymorphismus wurde mit einer verminderten Zytokinexpression assoziiert und deutet auf eine verringerte Promotorenaktivität hin (Veltkamp et al. 2007). Es finden sich Hinweise, dass NOD2 die TLR-2-vermittelte Immunantwort positiv aber auch negativ reguliert. So wird die TLR-2-vermittelte IL-1 β Expression und die IL-12 Expression in Leukozyten durch NOD2 gehemmt (Watanabe et al. 2004, Dahiya et al. 2011) und die Expression von IL-23 und α -Defensinen in Paneth-Zellen verstärkt (Kobayashi 2005, Tan et al. 2016).

1.2.3.3 Pathomechanismen des *Nuclear dot protein 52kDa (NDP52/CALCOCO2)*

Polymorphismus als Rationale für die Assoziation mit dem SBP-Risiko

NDP52 ist ein Negativ-Regulator in der TLR-vermittelten Signalkaskade, hemmt die NF-κB-abhängige pro-inflammatorische Genexpression und vermittelt Autophagie (Inomata et al. 2012). Der SNP (Referenzsequenz: GRCh38p7) NC_000017.10(CALCOCO2):g.46929908T>C(rs2303015), eine *Missense-Mutation* die zu einer veränderten Aminosäuresequenz an Position 248 (Alanin statt Valin) führt, ist mit Morbus Crohn assoziiert. Der mit der Mutation assoziierte Verlust der Fähigkeit die pro-inflammatorische TLR-abhängige Immunreaktion zu begrenzen, wird als Ursache für die Hyperaktivierung von NF-κB bei Morbus Crohn betrachtet. (Ellinghaus et al. 2013). Lutz et al. (2015) konnten die Minor-Variante von rs2303015 mit einem erhöhten SBP-Risiko bei alkoholischer Leberzirrhose (N = 87) assoziieren (OR:4,32; 95%-KI: 1,68-11,11; $P=0,001$). Der funktionelle Zusammenhang blieb ungeklärt. Als möglicher Pathomechanismus wurde die fehlende Negativ-Regulation der NF-κB-Aktivierung diskutiert, welche zur Aggravation der SBP führt.

1.2.3.4 Pathomechanismen des *Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1)*

Polymorphismus als Rationale für die Assoziation mit dem SBP-Risiko

Die Expression von MCP-1 erfolgt bei einer Vielzahl an Zelltypen, wie Epithel-, Endothel-, glatten Muskelzellen und Monozyten konstitutiv oder wird durch oxidativen Stress, Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Endotoxine induziert. Es spielt als Chemokin (CCL2) eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere von Monozyten und Makrophagen im Rahmen der inflammatorischen Immunabwehr (Yadav et al. 2010). Der Promotor-SNP (Referenzsequenz: GRCh38p7) NC_000017.11:g.34252769A>G(rs1024611), auch A-2518G genannt, geht mit einer verstärkten MCP-1 Expression bei der Minor-Variante einher (Rovin et al. 1999). Der SNP ist unter anderem mit CED, systemischem Lupus Erythematoses, rheumatischer Arthritis und Sepsis assoziiert (He et al. 2017). Gäbele et al. (2009) konnten den Wildtyp-Genotyp (AA) von rs1024611 mit einem erhöhten SBP-Risiko bei alkoholischer Leberzirrhose (N = 80) assoziieren (OR:3,42; 95%-KI: 1,21-9,64; $P=0,02$; berechnet aus publizierten Daten). Diese Assoziation wurde von Salama et al. (2014) für das Wildtyp-Allel Adenin bestätigt (OR:2,42; 95%-KI:1,04-5,63; $P=0,039$; berechnet aus publizierten

Daten). Als Pathomechanismus wird eine geringere MCP-1 Expression in der Peritonealhöhle gesehen, wodurch weniger Makrophagen rekrutiert werden und die Immunabwehr gegenüber einer SBP eingeschränkt ist.

1.2.3.5 Pathomechanismen des *Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 4 (NR1H4)* Polymorphismus als Rationale für die Assoziation mit dem SBP-Risiko

Der Farnesoid X Rezeptor (FXR), codiert vom *NR1H4* Gen, ist ein Kernrezeptor, welcher durch Gallensäuren aktiviert wird. Er wird hauptsächlich in Leber- und Darmzellen exprimiert und dient der Erhaltung der Gallensäuren-Homöostase, durch Suppression bzw. Induktion involvierter Gene z.B. von Enzymen zur Gallensäuresynthese (CYP7A1, CYP8B1, CYP27A1) oder Gallensalztransportern (*Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide, Bile Salt Export Pump*). Darüber hinaus wird das angeborene Immunsystem des Darmes und dessen Homöostase durch die Aktivität von FXR reguliert, was vor Inflammation und bakterieller Überbesiedlung schützt. (Attinkara et al. 2012). Polymorphismen im *NR1H4* Gen sind mit CED assoziiert, darunter auch der SNP (Referenzsequenz: GRCh38p7) NC_000012.12(NR1H4):g.100493323G>T(rs56163822) in der 5'-UTR Region in unmittelbarer Nähe zur Translationsstartsequenz. Als Pathomechanismus wird eine verminderte FXR-Proteinexpression diskutiert, wodurch die Homöostase des Darmimmunsystems gestört ist und in der Inflammation des Darmepithels resultiert (Attinkara et al. 2012). Die dadurch gestörte Barrierefunktion des Darmes soll eine verstärkte bakterielle Translokation ermöglichen, was als Ursache der SBP gilt. In diesem Zusammenhang konnten Lutz et al. (2014) die Minor-Variante von rs56163822 mit der SBP assoziieren (OR: 4,36; 95%-KI: 1,13–16,80; *P*=0,02; *N* = 293).

1.3 Die Bedeutung von TRAF6 als Mediator zellulärer Immunsignale bei Monozyten und Makrophagen

In diesem Kapitel wird die Schlüsselrolle des TRAF6-Moleküls für die intrazelluläre Signaltransduktion im Rahmen der angeborenen Immunabwehr dargestellt. Es werden wichtige Interaktionspartner, die Mechanismen der TRAF6-vermittelten Immunsignale und deren Konsequenzen, wie die Regulation der Transkription, erläutert (1.3.1, S.17). Ein besonderes Augenmerk wird auf *Toll-like Receptors* (TLR) -vermittelte Signaltransduktion gelegt, da diese für die Immunantwort von Monozyten und Makrophagen von herausragender Bedeutung sind und Störungen dieser in Verbindung zu inflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen gesehen werden (Kawai und Akira 2010) (1.3.2, S.20). Weiterhin werden Polymorphismen im bzw. mit Bezug zum *TRAF6* Gen vorgestellt (1.3.3, S.21).

1.3.1 Mechanismen der TRAF6 Protein-Protein-Interaktionen

Der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-assoziierte Faktor 6 (TRAF6) spielt eine zentrale Rolle in den Signalkaskaden des angeborenen Immunsystems. Es ist ein hoch konserviertes Protein, welches aus einer N-terminalen RING-Domäne, mindestens 4 weiteren Zink-Finger-Domänen, einer superspiralisierten (coiled-coil) TRAF-N Domäne und einer C-terminalen TRAF-C Domäne besteht (Abbildung 3, S. 18). Dabei dient die TRAF-C Domäne als Interaktionsstelle für das TRAF6-Bindungsmotiv von PRR bzw. deren Adaptorproteinen und Kinasen (Yin et al. 2009). Beispiele hierfür sind der TNF-Rezeptor *Cluster of Differentiation* (CD) 40, die *Toll-Like Receptor* (TLR) -Adaptorproteine *Myeloid differentiation response gene D 88* (MyD88) und *Toll/Interleukin-1 Receptor Domain-containing Adaptor inducing Interferon-beta* (TRIF) und die Interleukin-1-Rezeptor assoziierten Kinasen (IRAK) 1-4 (Walsh et al. 2015). Die Aktivierung von TRAF6 führt zu dessen Homo-Oligomerisation, welche Voraussetzung für die Ubiquitin E3 Ligaseaktivität von TRAF6 ist (Yin et al. 2009).

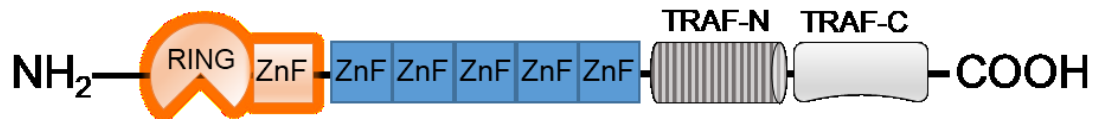


Abbildung 3: Domänenstruktur des TRAF6 Proteins

Das TRAF6 Protein besteht aus einer RING-Domäne am N-Terminus, welche mit der 1. Zink-Finger Domäne (ZnF) eine funktionelle Einheit bildet, mindestens 4 weiteren Zink-Finger-Domänen, einer superspiralisierten (coiled-coil) TRAF-N Domäne und einer C-terminalen TRAF-C Domäne.

Die RING-Domäne und die erste Zink-Finger-Domäne bilden eine minimale Funktionseinheit für die TRAF6-vermittelte Lys63-Polyubiquitinierung. Zusammen mit einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1 und dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym E2 (heterodimer aus Ubc13 und Uev1A) katalysiert TRAF6 als Lys63-spezifische E3 Ligase die kovalente Bindung des an Ubc13 gebundenen Ubiquitins an ein Lysin des Targetproteins bzw. daran bereits gebundener Ubiquitinmoleküle. Dabei erfolgt die Bindung zwischen dem C-terminalen Glycin und dem Lysin an 63. Position der Aminosäuresequenz des bereits gebundenen Ubiquitins (Yin et al. 2009). Typische Targetproteine für die TRAF6-vermittelte Ubiquitinierung im Rahmen der PRR-Signaltransduktion sind *Transforming Growth β -activated kinase 1* (TAK1) *binding Protein 2* (TAB) des TAK1:TAB2/3-Komplexes oder *NF- κ B essential modulator* (NEMO) des NEMO: *Inhibitor of κ B Kinase* (IKK)-Komplexes (Abbildung 4, S. 19), sowie TRAF6 selbst durch Autoubiquitinierung. Diese Proteine aktivieren infolge ihrer Ubiquitinierung die Signalwege von *Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), *Mitogen activated protein kinases* (MAPK), Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und der Interferon-regulierenden Faktoren (IRF) und resultieren schließlich in der Transkription entsprechender Zielgene, wie der pro-inflammatorischen Zytokine *IL6* und *TNF* (Walsh et al. 2015).

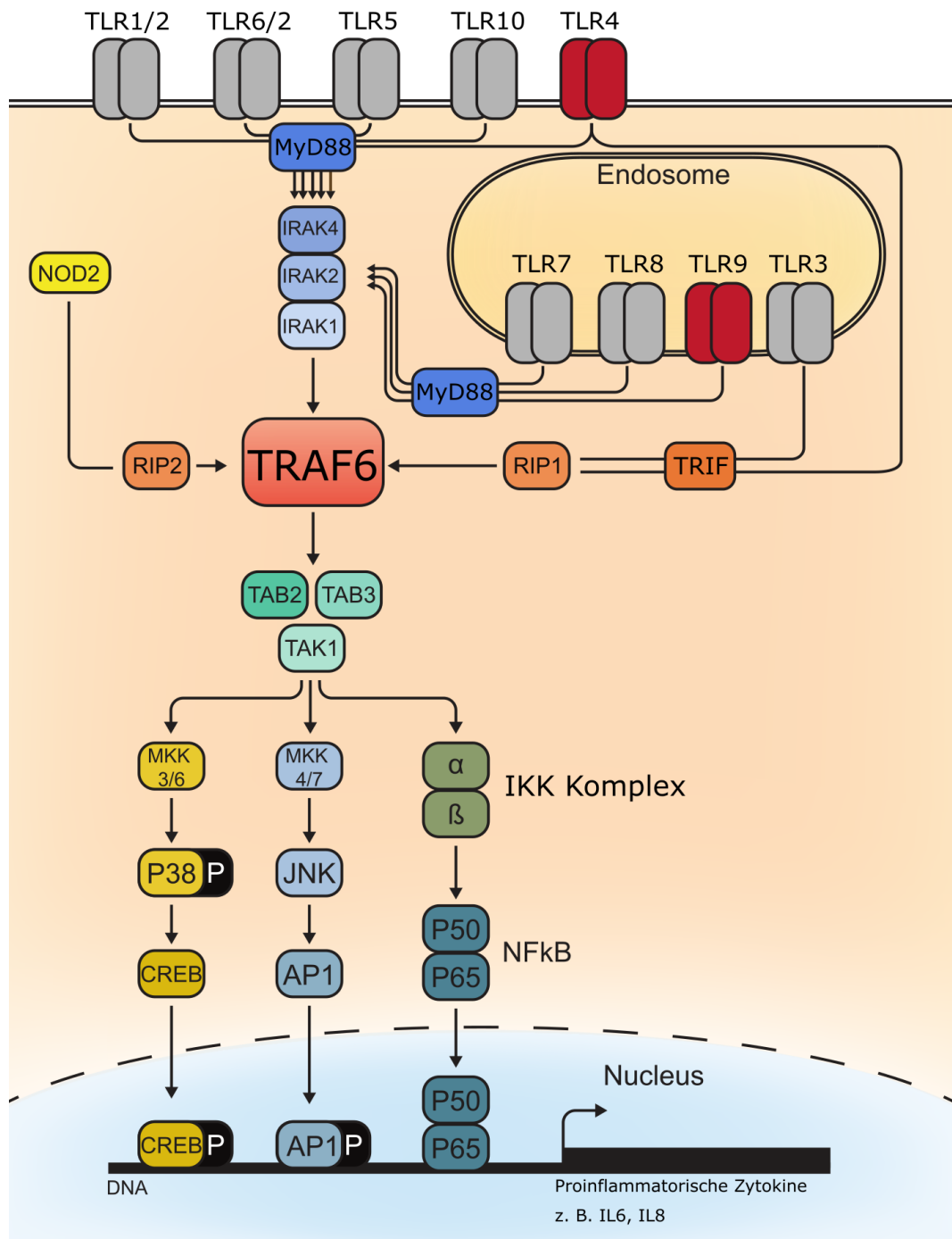


Abbildung 4: Die zentrale Bedeutung von TRAF6 für die TLR-induzierte Immunantwort bei Monozyten und Makrophagen

Die humanen Toll-like Rezeptoren 1-10 erkennen PAMPs und DAMPs. Sie befinden sich in der Plasmamembran, mit Ausnahme von TLR 3, 7, 8 und 9, welche sich in der Membran von Endosomen befinden. Gewöhnlich werden die Signale über den MyD88-abhängigen Signalweg vermittelt und führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und nachfolgend zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen. NF-κB kann durch TLR-4 alternativ auch über den TRIF-abhängigen Signalweg aktiviert werden. Dann ist jedoch die Interaktion mit TRAF6 essentiell, welche durch das *Receptor-interacting protein* (RIP) 1 vermittelt wird. Zudem ist eine NF-κB Aktivierung über NOD2 möglich, was die Interaktion von TRAF6 mit RIP2 erfordert.

1.3.2 Die Bedeutung von TRAF6 für die monozytäre Immunabwehr

Im Kontext einer SBP ist das Monozyten/Makrophagensystem nach Überwindung der Darmbarriere die erste Verteidigungslinie der Immunabwehr. Für diese spielt TRAF6 eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von *Toll-Like Receptor* (TLR) Signalen zur Immunaktivierung und zur Einleitung der adaptiven Immunantwort in Reaktion auf Stimulation der Rezeptoren durch PAMPs und DAMPs (Walsh et al. 2015). Es sind 10 verschiedene membranständige TLRs beim Menschen bekannt, TLR1-TLR10, welche aus einer Ektodomäne mit *Leucine-rich repeats* (LRRs), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Toll-Interleukin-1-Rezeptor (TIR) Domäne, welche für die intrazelluläre Signaltransduktion verantwortlich ist, bestehen. Nach Kawai und Akira (2010) können die TLR-Signalwege in den MyD88-abhängigen Signalweg und den TRIF-abhängigen Signalweg unterschieden werden. Für die MyD88-abhängige Signaltransduktion ist TRAF6 essentiell.

Darüber hinaus ist TRAF6 ein Mediator in den Signalwegen der intrazellulären PRRs und führt zur Immunaktivierung. In den *NOD-like Receptors* (NLRs) Signalwegen vermittelt TRAF6 über die Lys63-Polyubiquitinierung von RIP-2 die Aktivierung von NF- κ B (Yang et al. 2007). Im *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-1) like *Receptors* (RLR) Signalkaskaden wird TRAF6 über *Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein* (MAVS) aktiviert, infolgedessen der NF- κ B-Signalweg über die Aktivierung der *Mitogen-activated Protein kinase kinase kinase 1* (MEKK1) aktiviert wird (Yoshida et al. 2008).

Ergänzend zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine durch die Aktivierung von NF- κ B, führt TRAF6 durch Interaktion mit dem *Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate In Toll Pathway* (ECSIT)- Protein zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Mitochondrien von Makrophagen. Das dient der intrazellulären Abwehr von Bakterien (West et al. 2011, Wi et al. 2014).

Die Interaktion von TRAF6 mit CD40 initiiert die Differenzierung von Makrophagen zum pro-inflammatorischen M1-artigen Phänotyp (Lutgens et al. 2010).

Die Inaktivierung von TRAF6 durch Deubiquitinierung, vermittelt durch die Deubiquitinase A20, führt zur Endotoxintoleranz monozytärer Zellen (Xiong et al. 2011). Die molekularen Mechanismen, welche Endotoxintoleranz vermitteln, konnten jedoch bis heute nicht aufgeklärt werden (Seeley und Ghosh 2017).

1.3.3 Die Bedeutung von Polymorphismen im *TRAF6* Gen

Das *TRAF6* Gen liegt auf Chromosom 11 p12 und besteht aus mehr als 26kb. Es enthält 9 Exons, wovon 6 für das TRAF6 Protein kodieren (Exon 2-7). Es sind zwei alternative Spleißvarianten beschrieben, welche sich durch 93 bp (Exon 2b) im 5'-untranslatierten Bereich unterscheiden (Haft et al. 2018), daher kodieren beide Spleißvarianten für das gleiche Protein (Abbildung 5, S.41). *TRAF6*-Polymorphismen sind mit inflammatorischen Erkrankungen assoziiert:

- (1) **Systemischer Lupus erythematoses:** Bei Patienten mit systemischen Lupus erythematoses konnten Scofield et al. (2003) die zwei genetischen Marker D11s1392 (11p13) und D11s1985 (11p11.2), die in unmittelbarer Nähe zu *TRAF6* liegen, mit Thrombozytopenie assoziieren. Sandling et al. (2011) und Namjou et al. (2012) zeigten die Assoziation verschiedener *TRAF6* SNPs mit Systemischem Lupus erythematoses. Untersuchungen zu den funktionellen Mechanismen fehlen in diesen Studien.
- (2) **Rheumatoide Arthritis:** wurde von Amos et al. (2006) mit zwei intergenischen SNPs, in Nähe zum *TRAF6* Gen assoziiert. Raychaudhuri et al. (2009) zeigten dafür eine Assoziation mit dem *TRAF6* SNP NC_000011.10(*TRAF6*):g.36503743C>G(rs540386). Studien zu den funktionellen Mechanismen dieser SNPs fehlen bisher.
- (3) **Sepsis-assoziiertes Organversagen:** Song et al. (2012) konnten den *TRAF6* SNP NC_000011.10(*TRAF6*):g.36509094G>C(rs4755453) mit akutem Lungenversagen bei Sepsis assoziieren. Darüber hinaus zeigten sie in funktionellen Analysen an mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) eine verminderte basale *TRAF6* mRNA-Expression, wie auch nach Stimulation ex-vivo mit Lipopolysacchariden (LPS) für Patienten mit dem Minor Allel (C). Dies ging mit einer verminderten Zytokinsekretion einher.

Darüber hinaus wurden *TRAF6* SNPs mit malignen Melanomen (Yang et al. 2009) und diabetischer Nephropathie (Guo et al. 2016) assoziiert. Polymorphismen im Linkage zu *TRAF6* SNPs oder in relativer Nähe zum *TRAF6* Gen und vermutetem Linkage wurden mit ischämischem Schlaganfall (Su et al. 2015), idiopathisch-inflammatorischer Myopathie (Rothwell et al. 2016) und Asthma bronchiale (Savenije et al. 2014) assoziiert. Untersuchungen zu den funktionellen Mechanismen der SNPs wurden bisher nicht berichtet.

2 Fragestellungen und Ziele der eigenen Arbeit

Nach heutigem Kenntnisstand existieren nur mäßig gute klinische Parameter zur Einschätzung des individuellen Risikos für eine spontane Infektion bei Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose. Untersuchungen zur genetischen Prädisposition in der jüngeren Vergangenheit zeigten, dass Polymorphismen in Genen der angeborenen Immunabwehr mit einem erhöhten SBP-Risiko assoziiert sind. TRAF6 stellt durch seine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion im Rahmen der monozytären Immunabwehr ein vielversprechendes Schlüsselmolekül zur Erkennung von Patienten mit erhöhtem Infektionsrisiko dar und gleichzeitig ein mögliches Target für die Prophylaxe und/oder Therapie solcher Infektionen.

Im ersten Teil dieser Arbeit erfolgt der Identifizierung und Quantifizierung von *TRAF6* Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) und deren klinische Charakterisierung. Hierfür wurde eine kombiniert retro- und prospektive Studie an Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose durchgeführt. Folgende Fragestellungen sind Gegenstand dieser klinischen Kohorten Studie:

1. Gibt es eine Häufung von *TRAF6* SNPs bei Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose im Vergleich zur gesunden Population?
2. Entwickeln Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose und mit *TRAF6* SNPs gehäuft spontan bakterielle Infektionen (SBP)?
3. Ist der *TRAF6*-Haplotyp mit dem Verlauf und dem Phänotyp einer SBP assoziiert?
4. Ist der *TRAF6*-Haplotyp mit der Mortalität assoziiert?

Unter der Voraussetzung, dass es klinische Unterschiede im Infektionsrisiko der *TRAF6*-Haplotypen gibt, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die TRAF6-vermittelte monozytäre Immunantwort charakterisiert werden. Hierfür wurden zum einen Blut und Aszites auf Marker der Immunaktivierung analysiert und zum anderen Monozyten und Peritonealmakrophagen der Patienten isoliert und *in vitro* nach folgenden Fragestellungen untersucht:

5. Zeigen zirkulierende Monozyten und Peritonealmakrophagen bei Patienten ohne SBP eine Immunaktivierung, die mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert werden kann? Kann der *TRAF6*-Haplotyp durch ein Muster zirkulierender Zytokine und Makrophagen-Aktivierungsmarker in vivo differenziert werden und unterscheiden sich diese Muster zwischen systemischer Zirkulation und Aszites?
6. Gibt es Unterschiede bei dem basalen NF- κ B Aktivierungsgrad von Monozyten und Peritonealmakrophagen und können diese mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert werden?
7. Kann eine *ex vivo* Zellaktivierung mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert werden und gibt es PRR-spezifische Unterschiede?

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die funktionellen Wirkungsweisen der SNPs untersucht, um neue Ansatzpunkte für eine Therapie oder für eine nicht-antibiotische Prophylaxe der SBP aufzuzeigen. Folgende Fragestellungen wurden unter Beachtung des *TRAF6*-Haplotyps bearbeitet,

8. Besteht eine Assoziation zwischen dem *TRAF6*-Haplotyp und der *TRAF6* mRNA Expression?
9. Besteht eine Assoziation zwischen dem *TRAF6*-Haplotyp und der Expression der beiden *TRAF6*-Spleißvarianten?
10. Besteht eine Assoziation zwischen dem *TRAF6*-Haplotyp und der *TRAF6* Proteinexpression?
11. Besteht eine Assoziation zwischen dem *TRAF6*-Haplotyp und der Expression benachbarter Gene?
12. Besteht eine Assoziation zwischen dem *TRAF6*-Haplotyp und der Expression von *TRAF6*-Targetgenen? Wenn ja, haben diese Unterschiede Auswirkungen auf Proteinebene?

3 Material

3.1 Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Autoklav	ELV 5072	Tuttnauer Europe B.V., Breda, NL
Bildgebungssystem	LAS-3000	FujiFilm Holdings K.K., Minato, JP
CO ₂ -Inkubator	BBD6220 - Heraeus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Durchflusszytometer	3D FACS Calibur™ System	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Geldokumentations- system	G : Box	Syngene, Synoptics Ltd., Cambridge, GB
Horizontales Gelsystem	Perfect Blue™ Gelsystem Mini L	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, DE
MACS® Manual Separator	MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
Microplate Reader	Infinite® 200 PRO	Tecan Trading AG, Männedorf, CH
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Mikroskop	400x	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Netzgerät	Electrophoresis Power Supply EPS 600	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu 2	IBS-INTEGRA Bioscience AG, Zizers, CH
Pipettierhilfe	Eppendorf Research	Eppendorf® GmbH, Hamburg, DE
Real-Time PCR Cycler	Rotor-Gene Q	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Schüttelgerät	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, DE
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Sterilwerkbank	HeraSafe HS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Tank-Blotsystem	Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Thermocycler	Mastercycler 5330	Eppendorf® GmbH, Hamburg, DE

Vertikale Gelelektrophorese	PROTEAN® II xi Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Waage	Sartorius Basic BA 110S	Sartorius AG, Göttingen, DE
Zählkammer	Neubauerzählkammer	LO - Laboroptik Ltd, Lancing, GB
Zentrifuge	Universal 30F	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, DE
Zentrifuge	ROTANTA 460 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, DE
Zentrifuge	Zentrifuge 5427 R	Eppendorf® GmbH, Hamburg, DE

3.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
CellQuest Pro©	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
GeneSys image acquisition software	Syngene, Synoptics Ltd., Cambridge, GB
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
G*Power Version 3.1.9.2	http://gpower.hhu.de/ (Faul et al. 2007)
IBM SPSS Statistics 24.0	IBM Corp, Armonk, New York, USA
ImageJ 1.49	https://imagej.nih.gov/ij/download.html
NanoDrop 2000/2000c Software, Version 1.6	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Rotor-Gene Q Software 2.3	Qiagen GmbH, Hilden, DE
SnapGene® Software	GSL Biotech LLC, Chicago, USA
Webanwendung HWE	http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml (Rodriguez et al. 2009)
Webanwendung exakter <i>P</i> -Wert	https://www.cog-genomics.org/software/stats (Chang et al. 2015)

3.3 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Auslaufpipetten (5mL, 10mL, 25mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
FACS® Messröhrchen	BD Bioscience, Franklin Lakes USA
Falcon (15mL, 50mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Filterpapier	Whatman GmbH, Dassel, DE

Immobilon®-P PVDF Membrane	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DE
LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
PCR-Reaktionsgefäße (0,1 mL)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Pipettierspitzen (10µL, 200µL, 1000µL)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Reaktionsgefäße (500µL, 1500µL, 2000µL)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Zellkulturplatten (96 Well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE

3.4 Zellkulturbedarf

Bezeichnung	Hersteller
CpG von E. coli ssDNA/LyoVec™	InvivoGen, San Diego, USA
Fetales Bovine Serum	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
L-Glutamin Penicillin Streptomycin Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
LPS, E.coli K12	InvivoGen, San Diego, USA
Pam3CSK4	InvivoGen, San Diego, USA
PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Lonza Group Ltd, Base, CH
RPMI 1640 w/o L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin, DE

3.5 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamide (Rotiphoress® 37.5%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
Agarosegel Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
Bovine Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, DE
CD14 MicroBead, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
EDTA, Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
Enhanced Luminol Reagent Plus	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

Ethanol (vergällt, 98%)	Landesmonopolstelle Nordhausen, DE
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
FACS® Clean Solution	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
FACS® Flow sheath fluid	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
FACS® Rinse	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Mix (Fermentas)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
HEPES (Gibco)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Lympholyte®-H Cell Separation Media	Cedarlane Laboratories, Hornby, CA
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Nonident P-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
ProSieve™ 50 Gel Solution	Lonza Group Ltd, Basel, CH
Protease Inhibitor Cocktail	Hoffmann-La Roche, Basel, CH
Recombinant NF-κB p65 protein	Active Motif, La Hulpe, BE
RedSafe™	iNTRON Biotechnology Inc., KR
RNA Lyse Puffer	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg im Breisgau, DE
Roti® Nanoquant Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, DE
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Western Lightning Plus	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

3.6 Kits

Bezeichnung

DNeasy Blood and Tissue Kit
 Human CD163 Quantikine ELISA Kit

 Human LBP ELISA Kit
 Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase

 Micro BCA™ Protein Assay Kit

 Nuclear Extract Kit
 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit

 peqGOLD cDNA Synthesis Kit H Plus

 RayBio® Human IL-6 ELISA Kit
 RayBio® Human IL-8 ELISA Kit
 RNA MicroPrep Kit

 suPARnostic® AUTO Flex ELISA
 TaqMan® SNP Genotyping Assay
 (Assay ID: C____2899037_10)
 TransAM® NF-κB p65 ELISA Kit

Hersteller

Qiagen GmbH, Hilden, DE
 R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA

 Hycult Biotech Inc., Plymouth, USA
 Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

 Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

 Active Motif, La Hulpe, BE
 MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, DE

 Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, DE

 RayBiotech, Inc, Norcross, USA
 RayBiotech, Inc, Norcross, USA
 Zymo Research Europe GmbH, Freiburg im Breisgau, DE

 ViroGates, Birkerød, DK
 Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

 Active Motif, La Hulpe, BE

3.7 Western Blot Antikörper

Tabelle 1: Western Blot Antikörper

Antikörper	Klon	Spezies	Verdünnung	Hersteller
TRAF6	D21G3	Hase mAk	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA #8028
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	3D7	Hase mAk	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA #9215
p38 MAPK	polyklonal	Hase	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA #9212
Phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2) (Thr202/Tyr204)	E10	Maus mAk	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA #9106
p44/42 (ERK 1/2)	137F5	Hase mAk	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA #4695
JNK/SAPK1	37	Maus mAk	1:250	BD Biosciences, Franklin Lakes USA #610627
Phospho-JNK/SAPK (pT183/pY185)	41	Maus mAk	1:250	BD Biosciences, Franklin Lakes USA #612540
β-Aktin	AC-15	Maus mAk	1:5000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München Aldrich #A5441
Anti-Hase IgG (H+L), Peroxidase labelled	polyklonal	Ziege	1:20000 (stock 1mg/mL)	KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, USA
Anti-Maus IgG (H+L), Peroxidase labelled	polyklonal	Ziege	1:10000 (stock 0.5mg/mL)	KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, USA

Alle Antikörper wurden mit TBS-T + 1% BSA verdünnt. mAk: monoklonaler Antikörper

3.8 Puffer und Lösungen

Kulturmedium:		RPMI 1640	
	10% (v/v)	FBS	
	1% (v/v)	L-Glutamin Penicillin Streptomycin Lösung	
MACS-Puffer:		PBS	pH 7.4
	2 % (v/v)	FBS	
	2 mM	EDTA	
50x TAE Lauf-Puffer:	2 M	TRIS	pH 8,6
(TRIS-Acetate-EDTA)	1 M	Essigsäure	
	50 mM	EDTA	
RIPA-Puffer:	150 mM	NaCl	pH 7,6
	1.0 % (v/v)	Nonident P-40	
	0.5 % (v/v)	Natriumdeoxycholat	
	50 mM	TRIS	
	10 µL/mL	Protease-Inhibitor-Cocktail	
5x Proben-Puffer:	310 mM	TRIS	pH 6.8
	50 % (v/v)	Glycerin	
	3 % (w/v)	SDS	
	25 % (v/v)	β-Mercaptoethanol	
	0.05 % (w/v)	Bromophenolblau	
5% Sammelgel:	Für 10 mL		pH 6.8
	6,3 mL	dest. Wasser	
	2,6 mL	0.5M TRIS	
	1,0 mL	Acrylamide (Rotiphorese® 37.5%)	
	50 µL	SDS-Lösung, 20% (w/v)	
	50 µL	Ammoniumpersulfat, 20% (v/v)	
	10 µL	TEMED	
10% Trenngel:	Für 30 ml		pH 8.6
	18,1 mL	dest. Wasser	
	5,6 mL	2M TRIS	
	6,0 mL	ProSieve™ 50 Gel Solution	
	150 µL	SDS-Lösung, 20% (w/v)	
	150 µL	Ammoniumpersulphat, 20% (v/v)	
	12 µL	TEMED	
10x Lauf-Puffer:	250 mM	TRIS	pH 8,3
	2 M	Glycin	
	35 mM	SDS	
10x Transfer-Puffer:	250 M	TRIS	pH 10
	2 M	Glycin	
	10 % (v/v)	Methanol	
10x TBS-Tween:	100 mM	TRIS	pH 7,6
	1 M	NaCl	
	1 % (v/v)	Tween® 20	
Strip-Puffer:	100 mM	β-Mercaptoethanol	pH 6,7
	62,5 mM	TRIS	
	2% (w/v)	SDS	

4 Methoden

4.1 Studiendesign

In die klinische Kohortenstudie wurden 432 Patienten des Universitätsklinikums Jena, die infolge einer dekompensierten Leberzirrhose mit Parazentese des Aszites behandelt wurden, eingeschlossen. Die Rekrutierung erfolgte in drei Perioden: zwischen 12/2007 und 10/2010 im Rahmen der genetischen Assoziationsstudie von SBP und *NOD2* Varianten (N=105) (Bruns et al. 2012a), zwischen 10/2010 und 01/2013 im Rahmen einer Studie zur prognostischen Relevanz bakterieller DNA im Aszites (N=240) (Bruns et al. 2016a) und zwischen 06/2013 und 02/2015 zur Analyse der Bedeutung von *TRAF6*-Haplotypen für die peritoneale und systemische Immunität, sowie für das SBP-Risiko (N=87). Folgende Kriterien mussten für den Einschluss erfüllt sein:

1. Ärztliche Diagnose der Leberzirrhose auf der Grundlage eines histologischen Befundes oder der entsprechenden Konstellation aus klinischen, bildgebenden und laborchemischen Befunden;
2. Das Vorhandensein von Aszites, welcher für die diagnostische Punktion zugänglich ist;
3. Patientenalter von 18 Jahren oder älter;
4. Fähigkeit zur Einverständnisabgabe nach ärztlicher Aufklärung.

Es galten folgende Ausschlusskriterien (bereits das Zutreffen eines Kriteriums führte zum Ausschluss!):

1. Peritonealkarzinose;
2. Intraabdominelle, operativ bedingte/behandelbare Infektion, wie z.B. sekundäre Peritonitis;
3. Akute Pankreatitis.

Eine schriftliche Einverständniserklärung lag für alle Patienten zum Einschlusszeitpunkt vor. Die vorliegende Studie wurde von der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt (2880-08/10 und 3683-02/3). Die Durchführung der Studie erfolgte im Einklang mit der aktuell gültigen Version der Richtlinien aus der Deklaration von Helsinki aus dem Jahr 1964 ('World Medical Association Declaration of Helsinki' 2013).

Fallzahlplanung

Die Fallzahlberechnung erfolgte mit G*Power Version 3.1.9.2 (Faul et al. 2007) a priori mit dem Exakten Test nach Fisher. Aus HapMap Daten ergab sich eine Häufigkeit der beiden *TRAF6* TagSNPs (homo- oder heterozygot) von je 25% für die europäische Population („The International HapMap Project“ 2003). Daher wurden 3 Kontrollen pro Fall gewählt. Vorläufige eigene Daten wiesen auf ein SBP-Risiko von zirka 30% hin. 2,5 wurde als wahres Chancenverhältnis eine SBP zu entwickeln für Patienten mit dem Risiko *TRAF6*-Haplotyp gegenüber allen anderen *TRAF6*-Haplotypen angenommen. Die Studienpower sollte bei mindestens 80% liegen und als α -Fehler wurde 0,025 (2 SNPs) toleriert. Unter Berücksichtigung dieser Annahmen wurde in der initialen Fallzahlplanung eine Kohorte von 268 Patienten vorgesehen.

4.2 Patientendaten

Zum Zeitpunkt des Einschlusses wurden folgende Patientendaten erhoben: Geburtsdatum, Geschlecht, Ätiologie der Leberzirrhose, Child-Pugh Stadium, *Model for end-stage liver disease* (MELD) Score und die Diagnose von Karzinomen. Weiterhin wurden folgende Laborparameter, die im Rahmen der klinischen Routine untersucht wurden, erhoben:

Aszites: Gesamtzell-, Neutrophilen- (PMN), Protein- und Albumin-Konzentration.

Blut: Leukozyten- (WBC), Thrombozyten-, Albumin-, Alanin-Aminotransferase- (ALT), Aspartat-Aminotransferase- (AST), Gesamtbilirubin-, C-reaktives Protein- (CRP), Kreatinin-, Protein- und Natrium-Konzentration, sowie die *International normalized ratio* (INR).

Die Analysen erfolgten standardisiert und automatisiert am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Jena. Die Gesamtzell- und Neutrophilenkonzentration im Aszites, sowie die Thrombozyten- und Leukozytenkonzentration im Blut wurden im Sysmex XN Fluoreszenz-Durchflusszytometer (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) gemessen. Die INR wurde koagulometrisch mit dem ACL TOP™ (Instrumentation Laboratory, Werfen GmbH, München) bestimmt. Alle weiteren Parameter wurden mit dem vollautomatischen Analysesystem Architect der Firma Abbott (Illinois, USA) analysiert:

absorptionsspektrometrisch: Albumin im Plasma (Albumin BCP-Assay), Albumin im Aszites (MULTIGENT Microalbumin-Assay), Alanin-Aminotransferase (ALT, aktiviert-Assay), Aspartat-Aminotransferase (AST, aktiviert-Assay), Gesamtbilirubin (Diazo-Verfahren), C-reaktives Protein (MULTIGENT CRP Vario), Kreatinin (Jaffé-Methode) und Protein im Plasma und im Aszites (Biuret-Methode).

potentiometrisch an ionenselektiven Elektroden (ISE): Natriumkonzentration.

Die Patientenakten wurden bezüglich früherer Episoden einer spontan bakteriellen Peritonitis überprüft und bei jedem weiteren Krankenhausaufenthalt prospektiv auf SBP untersucht. Die Diagnose der SBP erfolgte gemäß internationaler Leitlinien (EASL 2010) durch den Nachweis einer erhöhten Neutrophilen-Konzentration im Aszites ($\geq 250/\mu\text{L}$) und wenn abdominelle Infektionsquellen sowie eine akute Pankreatitis ausgeschlossen werden konnten. Zusätzlich wurden für die erste SBP-Episode die oben genannten Patientendaten und Laborparameter, mikrobiologische Kulturergebnisse aus Blut und Aszites sowie Informationen zum Erwerb der Infektion erhoben. Trat die Infektion ab dem 3. Tag oder später während des stationären Aufenthalts auf, so galt diese Infektion als im Krankenhaus erworben (nosokomial). Trat die Infektion vor dem stationären Aufenthalt oder innerhalb der ersten 2 Tage des Aufenthaltes auf, so wurde die Infektion als ambulant-erworben gewertet. Die Gabe von Antibiotika zur Primärprophylaxe der SBP (Norfloxacin, Ciprofloxacin, Cotrimoxazol oder Rifaximin) und die Behandlung mit Betablockern wurden entweder prospektiv zum Studieneinschluss oder retrospektiv aus den elektronischen Patientenakten für Patienten, welche vor 10/2013 eingeschlossen wurden, erhoben. Daten zur Primärprophylaxe nach Studieneinschluss, wie auch Daten über eine Sekundärprophylaxe nach überstandener SBP, wurden *post hoc* nach dem Studienende (03/2015) aus den elektronischen Patientenakten erhoben. Die Patienten wurden bis zu ihrem Tod, einer Lebertransplantation, dem letzten dokumentierten Kontakt (Loss to Follow-up) oder dem Studienende beobachtet.

Von den gesunden Probanden wurden Vor- und Zunahme, sowie der *TRAF6*-Haplotyp dokumentiert. Eine schriftliche Einverständniserklärung lag für alle gesunden Probanden zum Einschlusszeitpunkt vor. Die Zellproben wurden zur Überprüfung der Reinheit der immunomagnetischen CD14⁺-Zellseparation genutzt.

4.3 Genotypisierung

4.3.1 DNA Extraktion aus EDTA-Vollblut

Die Isolation genomischer DNA aus 200 µL EDTA-Vollblut erfolgte nach Herstellerangaben mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen GmbH). Die Proben wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 20 ng/µL DNA eingestellt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mithilfe des NanoDrop 2000c Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific Inc.) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zur Überprüfung der Reinheit wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm ermittelt. Proben mit einem Verhältnis von $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$ wurden als „rein“ betrachtet. Die Messdaten wurden mit der zugehörigen Steuerungssoftware NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.) ausgewertet.

Alle Polymerasen-Kettenreaktion-Reaktionen (PCR) zur Genotypisierung erfolgten im Rotor-Gene Q real-time PCR Cycler (Qiagen GmbH). Als Steuerungs- und Auswertungssoftware wurde Rotor-Gene Q Software 2.3 (Qiagen GmbH) verwendet.

4.3.2 Genotypisierung für die Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) rs331457 und rs5030419 unter Verwendung der Schmelzkurvenanalyse mit FRET-Hybridisierungssonden

Die Untersuchung der *TRAF6* SNPs (Referenzsequenz: GRCh38p7) NC_000011.10(*TRAF6*):g.36502062C>T(rs331457) und NC_000011.10(*TRAF6*):g.36509193G>C(rs5030419) erfolgte im Anschluss einer PCR über eine Schmelzkurvenanalyse mit Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Hybridisierungssonden. Die PCR fand im 15 µL Reaktionsansatz mit der Invitrogen™ Platinum™ *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) entsprechend des Herstellerprotokolls statt. Es wurden 24 ng DNA, 0,2 µM Primer und 80 nM fluoreszenz-markierte FRET-Hybridisierungssonden eingesetzt. Die Primer- und Sondensequenzen können Tabelle 2 (S. 36) entnommen werden. Das Design der Primer und Sonden erfolgte mit Primer3 (Untergasser et al. 2012). Als Kontrollen wurden jeweils wildtyp, heterozygot und homozygot mutierte DNA des zu untersuchenden SNPs, sowie eine Wasserprobe als Negativkontrolle mitgeführt. Nach der initialen Denaturierung der DNA für 5 Minuten bei 95°C liefen die folgenden PCR-Schritte zyklisch ab:

- I Denaturierung der DNA für 20 Sekunden bei 95°C
- II Primerhybridisierung für 20 Sekunden bei 60°C
- III Elongation durch die Taq-DNA-Polymerase für 30 Sekunden bei 72°C.

Nach 35 Reaktionszyklen folgte eine dreiminütige Elongationsphase bei 72°C. Zur Vorbereitung auf die Schmelzkurvenanalyse wurden die Proben für 2 Minuten auf 95°C erhitzt, auf 30°C gekühlt und für 3 Minuten gehalten um anschließend in 1°C Schritten auf 75°C erhitzt zu werden. Die Verweildauer bei jedem Temperaturschritt betrug 4 Sekunden. Während jedes Schrittes wurde die Fluoreszenzmessung für alle Wellenlängen größer als 610 nm durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 470 nm.

4.3.3 TaqMan Analyse für *TRAF6* SNP rs5030445

Zur Validierung der Haplotypen wurden alle Patienten für einen dritten SNP im *TRAF6* Gen (Referenzsequenz: GRCh38p7), NC_000011.10(*TRAF6*): g.36500710T>C(rs5030445), untersucht. Dieser liegt im *Linkage Disequilibrium* (LD) mit rs331457. Die Genotypisierung für rs5030445 (Assay ID: C__2899037_10) erfolgte nach Herstellerangaben mit dem TaqMan® SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific Inc.).

4.3.4 Validierung der *TRAF6* SNPs mittels Sequenzierung

Es wurden 15 Patientenproben für rs331457 und rs5030419 sequenziert. Die Sequenzierung nach der Sanger erfolgte durch MacroGen Europe (Amsterdam, NL). Die DNA-Templates wurden entsprechend der Herstellervorgaben vorbereitet. Die Generierung dieser erfolgte mittels PCR mit der Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) im 50 µL Reaktionsansatz nach Herstellerangaben. Es wurden zwischen 20 ng und 40 ng DNA und 0,2 µM Primer eingesetzt. Das Design der Primer erfolgte mit Primer3 (Untergasser et al. 2012). Die Primersequenzen können Tabelle 2 (S. 36) entnommen werden. Nach der initialen Denaturierung der Proben für 2 Minuten bei 94°C, folgten 30 Zyklen aus Denaturierung (30 Sekunden, 94°C), *Annealing* (20 Sekunden, 60°C) und Extension (30 Sekunden, 72°C). Die Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) erfolgte entsprechend Herstellerangaben, wobei der im Kit enthaltene NTI-Puffer

1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt wurde. Die Sequenzierungsdaten wurden mit der SnapGene® Software (GSL Biotech LLC) analysiert.

4.3.5 TaqMan Analyse für *NOD2*- Genvarianten

Wie Appenrodt et al. (2010) und Bruns et al. (2012a) zeigten, gehen Variationen im *NOD2*-Gen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer SBP einher. Daher wurde die Kohorte zusätzlich auf die folgenden genetischen Varianten (Referenzsequenz: GRCh38p7) mittels TaqMan PCR, wie zuvor bei Bruns et al. (2012a) beschrieben, untersucht:

- NC_000016.10(*NOD2*):g.50712015C>T(rs2066844)
- NC_000016.10(*NOD2*):g.50722629G>C(rs2066845)
- NC_000016.10(*NOD2*):g.50729867_50729868insC(rs2066847).

Tabelle 2: Sequenzen der Genotypisierungsprimer und -sonden

Gen	Nukleotidsequenz
<i>TRAF6</i> rs331457 (FRET)	
vorwärts	TCTCCACACTGAGCATTTGG
rückwärts	ACAGTAAGTGTTCACTAAGCATC
Donor-Sonde	CACTGAACTGCTAGCCATACT-FL
Akzeptor-Sonde	LC610-TTCCCTTCAGCTCAGGATACTTCAAG-PH
<i>TRAF6</i> rs5030419 (FRET)	
vorwärts	CAGCTGAGTTAGGACTGTC
rückwärts	ATGATAGCGGCCAAGTTCAC
Donor-Sonde	CTATTACTGAATGTCTTGTTAC-FL
Akzeptor-Sonde	LC640-CAGGTTCCATGTAGAAACGAGAAAAACT-PH
<i>TRAF6</i> rs331457 (Sequenzierung)	
vorwärts 1	AGCACCTCAGTTGTAATACTCTT
vorwärts 2	TGTTTGTTTCCTGTGATTGAGCT
rückwärts	CTCCACACTGAGCATTTGGA
<i>TRAF6</i> rs5030419 (Sequenzierung)	
vorwärts 1	GTGATCCTGTACCCACCACA
vorwärts 2	TTGAAAAGCCCCTCTCCCTT
rückwärts	CAGACGCCGGGTTGATAAAG

4.4 Analyse monozytärer Primärzellen

4.4.1 Zellextraktion aus Patientenmaterial

Zur Untersuchung der Monozyten und Peritonealmakrophagen wurden je Patient 18 mL EDTA Vollblut und 500 mL Aszites aufgearbeitet. Das Zellmaterial des Aszites wurde mittels Zentrifugation (Thermo Fisher Scientific Inc.) für 10 Minuten bei $800 \times g$ angereichert. Die Zellpellets wurden in 8 mL des entsprechenden zellfreien Aszites resuspendiert. Für die Gewinnung mononukleärer Zellen wurden die Blut- und die zellangereicherten Aszitesproben einer Dichtegradientenzentrifugation mit Lympholyte®-H Cell Separation Media (Cedarlane Laboratories) unterzogen. Dafür wurden 4 mL Separationsmedium mit je 8 mL Probenmaterial überschichtet und für 15 Minuten bei $800 \times g$ und Raumtemperatur im Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert (Thermo Fisher Scientific Inc.). Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, gewaschen, gezählt und in $95 \mu\text{L}$ je 10^7 Zellen MACS-Puffer (3.8, S. 30) aufgenommen.

Die Positivisolation von Monozyten und Peritonealmakrophagen aus der mononukleären Zellsuspension erfolgte immunomagnetisch mittels MACS (Magnetic Cell Separation). Dafür wurden die Proben mit $5 \mu\text{L}$ je 10^7 Zellen MicroBead-gekoppelten anti-human CD14 Antikörpern (Miltenyi Biotec GmbH) für 15 Minuten bei 4°C inkubiert, anschließend gewaschen und in $500 \mu\text{L}$ je 10^8 Zellen MACS-Puffer (3.8, S. 30) resuspendiert. Die magnetische Separation erfolgte manuell mit dem MidiMACS™ Separator und LS Säulen nach Herstellerangaben (Miltenyi Biotec GmbH). Die so gewonnenen, CD14-positiven (CD14^+), Monozyten und Peritonealmakrophagen wurden für RNA/Protein-Extraktion schockgefroren oder für *in vitro* Experimente kultiviert. Die Reinheit der Zellextraktion wurde durchflusszytometrisch (in Prozent CD14^+) bestimmt und lag bei $\geq 95 \%$ (5.2, S.47).

4.4.2 Zellkultur und Stimulation mit LPS oder CpG

Es wurden 500.000 Zellen je 96-Well mit $200 \mu\text{L}$ Kulturmedium (3.8, S. 30) für 24 Stunden bei 37°C im CO_2 -Inkubator kultiviert. Die Stimulationsproben erhielten zusätzlich entweder 10 ng/mL LPS, $0,5 \mu\text{g/mL}$ Pam3CSK4 oder $10 \mu\text{g/mL}$ CpG-ODN (alle InvivoGen). Nach 24 Stunden Kultur wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die Zellen wurden

nach einem Waschschrift mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Lonza Group Ltd) direkt im Well lysiert. Für die RNA-Proben erfolgte die Lyse mit RNA Lyse Puffer (Zymo Research Europe GmbH) und für die Protein-Proben erfolgte diese mit RIPA-Puffer (3.8, S. 30). Die Zelllysate wurden bis zur RNA/Protein-Extraktion bei -80°C gelagert.

4.4.3 Genexpressionsanalyse

RNA Extraktion

Die Isolation der RNA erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls mit dem RNA MicroPrep Kit und DNA-Verdau auf der Säule (Zymo Research Europe GmbH). Dabei wurde die RNA selektiv an die Silica-Säule adsorbiert, mittels verschiedener Waschschriffe aufgereinigt und anschließend mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem NanoDrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zur Überprüfung der Reinheit wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm ermittelt. Proben mit einem Verhältnis von $A_{260}/A_{280} \sim 2,0$ wurden als „rein“ betrachtet. Die Messdaten wurden mit der zugehörigen Steuerungssoftware NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.) ausgewertet.

Reverse Transkription (RT)

Es wurden 500 ng RNA mit dem peqGOLD cDNA Synthesis Kit H Plus (Peqlab Biotechnology GmbH) revers transkribiert. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben unter Verwendung von random Hexamer-Primern im Mastercycler 5330 (Eppendorf® GmbH). Die RNA wurde zusammen mit den random Hexamer-Primern für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zugabe der RT-Reagenzien erfolgte die reverse Transkription nach folgendem Temperaturprotokoll: 25°C für 5 Minuten, anschließend 42°C für 60 Minuten und Termination der Reaktion bei 70°C für 5 Minuten. Die neu synthetisierte cDNA wurde bei minus 20°C gelagert.

Quantitative PCR der cDNA (qRT-PCR)

Die qRT-PCR erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen GmbH) im 15 µL Reaktionsansatz mit je 0,2 µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Für die Reaktion wurden 2 µL verdünnte cDNA (1:10 (v/v)) mit

nukleasefreiem Wasser) eingesetzt. Jede Probe wurde je Primerpaar mindestens in Duplikaten bestimmt. Die cDNA Proben wurden initial für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend in 40 PCR-Zyklen amplifiziert. Jeder Zyklus beinhaltete eine Denaturierungsphase bei 95°C für 5 Sekunden gefolgt von der kombinierten Primerhybridisierungs-/Elongationsphase bei 60°C für 10 Sekunden. Am Ende jedes Elongationsschrittes wurde die Fluoreszenz des DNA-SYBR Green-Komplexes aufgezeichnet. Zur Qualitätskontrolle der PCR-Produkte erfolgte nach Abschluss der PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse. Hierfür wurden die Proben von 55°C auf 95°C in 1°C Schritten erhitzt. Für jeden Temperaturschritt wurde die Fluoreszenzintensität bei 510 nm mit dem geräteinternen Photomultiplier (PMT) Detektor des Rotor-Gene Q real-time PCR Cyclers (Qiagen GmbH) bestimmt. Alle Messungen erfolgten im Rotor-Gene Q real-time PCR Cycler (Qiagen GmbH). Als Steuerungs- und Auswertungssoftware wurde Rotor-Gene Q Software 2.3 (Qiagen GmbH) verwendet. Zur relativen Quantifizierung wurden die Expressionsdaten gegenüber ihrer jeweiligen (mRNA) *ACTB* Gehalte normalisiert. Dies erfolgte mit der komparativen C_T – Methode (Livak und Schmittgen 2001), modifiziert für die Darstellung einzelner Expressionsdaten, wie folgt:

$$relative\ Expression = 2^{-\Delta C_T};$$

$$\text{mit } \Delta C_T = C_{T\ (Gen\ X)} - C_{T\ (ACTB)}$$

Diese Methode setzt eine PCR-Effizienz von 100% voraus. Die PCR-Effizienzen für *TRAF6* und *ACTB* wurden initial bestimmt und betrugen 107% und 104%, sodass die Auswertung mit der komparativen C_T -Methode zulässig war. Für alle anderen Gene wurden die Effizienzen als vergleichbar zu *ACTB* abgeschätzt.

Die Primersequenzen können Tabelle 3 (S. 40) entnommen werden. Das Design der Primer erfolgte mit Primer3 (Untergasser et al. 2012).

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer

mRNA	Länge (bp)	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer
TRAF6 ^{*1}	210	TGGCATTACGAGAAGCAGTG	GTTCCATCTTGTGCAAACAACC
ACTB ²	250	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTACGCACGAT
A20/ TNFAIP3 ^{*3}	231	AACATTTTGCTGCTGCCTC	AGGTGCTTTGTGTGGTTTCG
IL6 ^{*4}	101	AATTCGGTACATCCTCGACGG	GGTTGTTTTCTGCCAGTGCC
IL1B [*]	110	GAAGCTGATGGCCCTAAACA	AAGCCCTTGCTGTAGTGGTG
TNIP1 [*]	155	TCCAGGAGCCCTAGGAGTG	AGGGTAGCTCAGCCCCTG
CD80 [*]	110	GTGCCAGCTCTTCAACAGAA	GCTGGCTGGTCTTTCTCACT
CXCL8 [*]	107	TCCTGATTTCTGCAGCTCTGT	AAATTTGGGGTGGAAAGTT
IFNG [*]	92	CGAGATGACTTCGAAAAGCTG	TCAGCCATCACTTGGATGAG
IFNB1	95	CTTTCGAAGCCTTTGCTCTG	CAGGAGAGCAATTTGGAGGA
IL10 [*]	206	GCCTAACATGCTTCGAGATC	TGATGTCTGGGTCTTGGTTC
TNF [*]	226	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	CTGGTAGGAGACGGCGATG
PRR5L [*]	194	TGAACGAAAACATCAGGCGG	CTGCAGGGTAGGGAGAGTCT
Nested-PCR Primer			
TRAF6- Matrize [*]	283/ 376	ATCCAGAGTTTGCCGTCCAA	GCAGTTCCACCCACACTATC
TRAF6_v1 [*]	112	CTGTGTCCGTCTCTACCAG	TGATTATCACTTGCTCGTTCTAG
TRAF6_v2 [*]	137	CTGTGTCCGTCTCTACCAG	AGCACACAAAGAAAGCTGGG

*exonübergreifend; ¹ (Xinwei 2012); ² (Wang et al. 2012); ³ (Xiong et al. 2011); ⁴ (Zhou et al. 2003)

4.4.4 Analyse von TRAF6-Spleißvarianten

Für das *TRAF6* Gen sind 2 Spleißvarianten bekannt (Haft et al. 2018). Der Nachweis dieser Spleißvarianten erfolgte mithilfe einer *nested PCR*, bei welcher in einer ersten Amplifikation die *TRAF6*-DNA für die sich anschließende 2. PCR, zum Nachweis der Spleißvarianten, angereichert wurde. Die Anreicherungs-PCR erfolgte im 15 µL Reaktionsansatz mit der Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) entsprechend des Herstellerprotokolls unter Verwendung von 1 µL cDNA (4.4.3, S. 38). Nach der initialen Denaturierung für 5 Minuten bei 95°C folgten 20 Zyklen mit: 20 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 20 Sekunden Primerannealing bei 60°C und einer Extensionsphase von 30

Sekunden bei 72°C. Abschließend folgte eine verlängerte Extensionsphase für 3 Minuten bei 72°C. Das *TRAF6* PCR-Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Der Nachweis der Spleißvarianten erfolgte mit einer qRT-PCR, wie in Abschnitt 4.4.3 (S. 38) beschrieben, mit dem Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen GmbH). Es wurden 2 µL des 1:500 (v/v) mit nukleasefreiem Wasser verdünnten *TRAF6* PCR-Produktes als DNA-Matrize eingesetzt. Die Messungen erfolgten im Rotor-Gene Q real-time PCR Cyclyer (Qiagen GmbH). Als Steuerungs- und Auswertungssoftware wurde Rotor-Gene Q Software 2.3 (Qiagen GmbH) verwendet. Zur Normalisierung der Daten wurde die Expression der (mRNA)*TRAF6_v2* gegenüber der Expression der (mRNA)*TRAF6_v1*, welche als interne Kontrolle diente, ausgewertet ($relative\ Expression = 2^{-(C_{T(v2)} - C_{T(v1)})}$). Die Primersequenzen können Tabelle 3 (S. 40) entnommen werden. Das Design der Primer erfolgte mit Primer3 (Untergasser et al. 2012). Eine schematische Darstellung für das alternative Spleißen zeigt Abbildung 5.

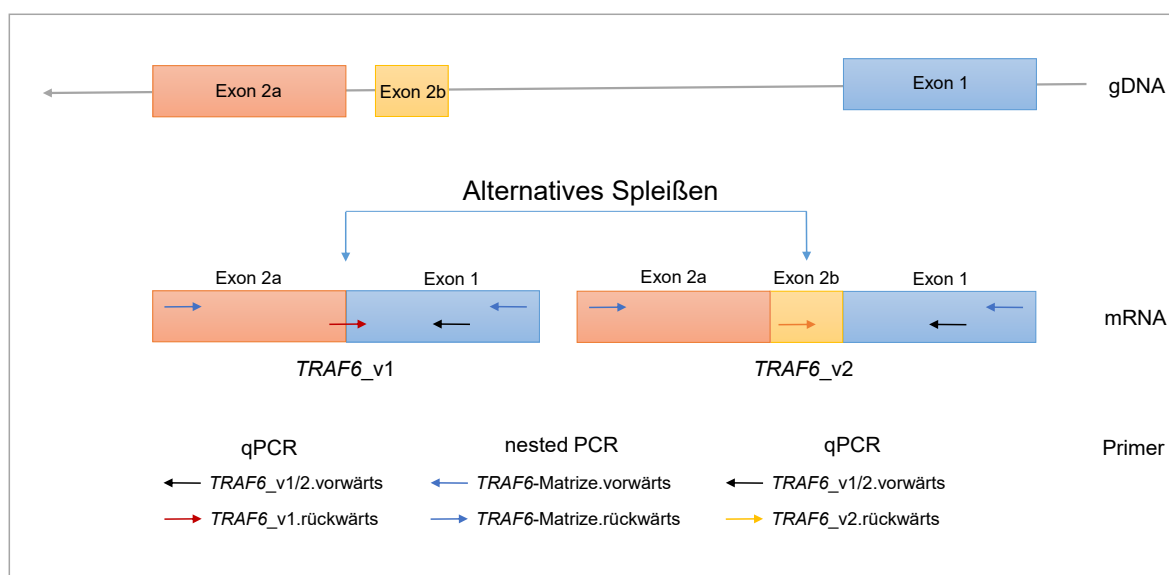


Abbildung 5: Primer zur Analyse des alternativen Spleißens von *TRAF6*.

Die zwei alternativen Spleißvarianten von *TRAF6* unterscheiden sich durch 93 bp (Exon 2b) im 5'-untranslatierten Bereich. Dabei stellt (mRNA)*TRAF6_v1* im Vergleich zu (mRNA)*TRAF6_v2* die kürzere Variante dar. Die nested PCR Primer ermöglichen die PCR beider Spleißvarianten. Auf dieser DNA-Matrize basiert die qPCR zur Quantifizierung der unterschiedlichen Spleißvarianten. Dies ist durch die Verwendung Spleißvariantenspezifischer Rückwärts Primer möglich. Für (mRNA)*TRAF6_v1* handelt es sich um einen exonübergreifenden Primer, das heißt ein Teil des Primers bindet auf Exon 1 und der zweite Teil auf Exon 2a. Der Rückwärts Primer für (mRNA)*TRAF6_v2* bindet auf Exon 2b, welches bei (mRNA)*TRAF6_v1* fehlt.

4.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Vor der Analyse von Patientenproben wurde die Eignung des PCR-Protokolls für jedes einzelne Primerpaar evaluiert. Zusätzlich wurde die Spezifität jedes Primerpaares mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Hierfür wurde ein 2-prozentiges (w/v) Agarose-Gel mit einfach konzentriertem Tris-Acetat-EDTA-Laufpuffer (3.8, S. 30) und Zusatz des Nukleinsäurefarbstoffes RedSafe™ (1 µL pro 20 mL Gel; iNTRON Biotechnology Inc.) hergestellt. Es wurden je 8,5 µL der Probe mit 2,0 µL des sechsfach-konzentrierten Agarosegel-Ladepuffers (Thermo Fisher Scientific Inc.) in die Probenaschen gegeben. Als Referenz wurde ein Längenstandard (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc.) im Gel mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte für 1,5 Stunden bei 100 V (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Die DNA-Banden wurden mit dem Syngene G Box Geldokumentationssystem (Synoptics Ltd.) detektiert und der zugehörigen Geräte-Software ausgewertet.

4.4.6 Western Blot und SDS-Page

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) entsprechend Herstellerangaben. Die Absorptionsmessung erfolgte im Microplate Reader (Tecan Trading AG) bei 562 nm. Zur Probenaufbereitung wurde das Zelllysate mit 5× Probenpuffer (3.8, S. 30) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Zur Separierung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dafür wurde ein Trenngel mit 10% (v/v) Acrylamid (3.8, S. 30) hergestellt und mit einem Sammelgel (5% (v/v) Acrylamid; 3.8, S. 30) überschichtet. Es wurden 6 µg (für TRAF6) bzw. 25 µg (für MAP-Kinasen) der denaturierten und negativ-geladenen Proteinproben in die Probenaschen des Sammelgels aufgetragen. Als Referenz wurde eine Probenasche mit 10 µL des farbigen Größenstandards PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.) befüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte in der PROTEAN® II xi Cell Elektrophorese Apparatur (Bio-Rad Laboratories, Inc.) in 1x-Laufpuffer (3.8, S. 30) bei 45 mA und max. 400 V für ca. 2,5 Stunden (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Für den Proteintransfer aus dem Gel auf die Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Merck Millipore KGaA) wurde das Tank-Blotsystem Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) verwendet.

Vorbereitend wurde die PVDF Membran mit Methanol (Carl Roth GmbH + Co. KG) aktiviert, in destilliertem Wasser gewaschen und abschließend zusammen mit dem Filterpapier (Whatman GmbH) und dem Gel für 30 Minuten in 1× Transferpuffer (3.8, S. 30) äquilibriert. Das Blotting-Sandwich, bestehend aus drei Filterpapieren (Whatman GmbH), der PVDF Membran (Merck Millipore KGaA), dem Gel und drei weiteren Filterpapieren (Whatman GmbH), wurde zum Proteintransfer aus dem Gel auf die Membran in die XCell Box (Bio-Rad Laboratories, Inc.) überführt. Der Proteintransfer erfolgte für 100 Minuten bei 0,75 mA (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) je Gel. Die PVDF Membran (Merck Millipore KGaA) wurde zur Blockierung freier Proteinbindestellen, in 1× TBS-T (3.8, S. 30) mit 1% (w/v) BSA (PAA Laboratories GmbH) für 30 Minuten inkubiert und entsprechend der zu analysierenden Proteingrößen geschnitten. Folgende Signalmoleküle und gegebenenfalls deren Phosphorylierungsgrad wurden analysiert (3.7, S.29): TRAF6 (60 kDa), p38 MAPK (T180/Y182, 43 kDa), JNK/SAPK1 (T183/Y185, 43/56 kDa), Erk1/2 (T202/Y204, 42/44 kDa) und β -Aktin (42 kDa) als Ladekontrolle. Die so vorbereiteten Membranen wurden über Nacht bei 4°C und kontinuierlichem Schütteln mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in 1× TBS-T (3.8, S. 30) gewaschen und mit einem geeigneten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 1, S.29) für 30 – 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal in 1× TBS-T (3.8, S. 30) für je 10 Minuten gewaschen. Für die Proteindetektion wurde die durch HRP-katalysierte Chemolumineszenz Reaktion genutzt. Hierfür wurde die Membran mit Luminol basiertem Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer Inc.) entsprechend Herstellervorgaben für 1 Minute getränkt und mit Hilfe des LAS-3000 Bildgebungssystems (FujiFilm Holdings K.K.) dokumentiert. Um die Membran für weitere Proteindetektionen zu nutzen wurden Primär- und Sekundärantikörper durch Inkubation der Membran für 30 Minuten bei 55°C in Stripping-Puffer (3.8, S. 30) entfernt. Nach Spülung mit destilliertem Wasser und 1× TBS-T (3.8, S. 30) standen die Membranen erneuten Proteindetektionszyklen zur Verfügung. Die densitometrische Analyse der Western Blot Aufnahmen erfolgte mit ImageJ 1.49 (Schneider et al. 2012). Die Proteinexpression wurde relativ zur entsprechenden β -Aktin Expression normiert.

4.4.7 Bestimmung aktiven NF-κBs

Zur Überprüfung des basalen NF-κB Aktivierungsgrades bei unkultivierten Peritonealmakrophagen wurden nukleäre Proteine mit dem Nuclear Extract Kit (Active Motif) entsprechend des Herstellerprotokolls isoliert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford Methode mit der Roti® Nanoquant Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG) in Mikrotiterplatten nach Herstellervorgaben. Mit dem TransAM® NF-κB p65 ELISA Kit (Active Motif) wurde die aktive NF-κB-Untereinheit p65 bestimmt. Hierbei handelte es sich um einen DNA-Bindungs-basierten ELISA, bei dem der aktivierte Transkriptionsfaktor nicht über einen immobilisierten Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden wird, sondern an doppelsträngige Oligonukleotide mit der entsprechenden Konsensussequenz. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Es wurde je Probe die maximal mögliche Proteinmenge, jedoch nicht mehr als 40 µg nukleäres Protein, eingesetzt. Zur Bestimmung der p65-Konzentration wurde eine Standardkurve mit acht Verdünnungsstufen, bekannter Konzentration, Rekombinanten NF-κB p65 Proteins (Active Motif) angefertigt. Die Messergebnisse wurden für den Vergleich zwischen den Proben, relativ zur eingesetzten Proteinmenge, in ng (p65-Protein) / µg (nukleäres Protein) umgerechnet.

4.4.8 Bestimmung von Entzündungsmarkern in Blut, in Aszites und in Zellkulturüberständen monozytärer Zellen

Zur Charakterisierung des klinischen Phänotyps wurden folgende Entzündungsmarker im Serum und/oder Aszites bestimmt: Interleukin-6 (IL-6; Serum), Chemokin CXCL8 (Aszites), löslicher Urokinase-Plasminogen-Aktivator Rezeptor (suPAR; Aszites, Serum), Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP; Serum), lösliches CD163 (sCD163; Aszites). Zusätzlich wurde die Sekretion von IL-6, CXCL8 und suPAR in Zellkulturüberständen von Monozyten und Peritonealmakrophagen bestimmt. Die Analyse erfolgte mittels ELISA im Mikrotiterplattenformat mit geeigneter Probenvorverdünnung und gemäß der Herstellerprotokolle:

- **IL-6:** RayBio® Human IL-6 ELISA Kit (RayBiotech, Inc)
- **CXCL8:** RayBio® Human IL-8 ELISA Kit (RayBiotech, Inc)
- **LBP:** Human LBP ELISA Kit (Hycult Biotech Inc.)
- **suPAR:** suPARnostic® AUTO Flex ELISA (ViroGates)
- **sCD163:** Human CD163 Quantikine ELISA Kit (R&D).

4.5 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die klinischen Basisdaten, sowie die Daten der ersten SBP-Episode wurden mittels Median/Interquartilabstand (IQR) für stetige Variablen und als Anzahl/Prozent für diskrete Variablen dargestellt. Die Untersuchung auf Unterschiede der zentralen Tendenz kontinuierlicher Variablen erfolgte mit dem Mann-Whitney *U*-Test (zweiseitig, Konfidenzintervall (KI): 95%) zwischen zwei Gruppen und dem Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Bonferroni-Tests als *post hoc*-Tests für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen. Unterschiede zwischen diskreten Variablen wurden mit dem Exakten Test nach Fisher überprüft. Die Risikofaktoren für eine SBP wurden mit einem logistischen Regressionsmodell bestimmt. Kaplan-Meier Analysen wurden bei der Überlebenszeitanalyse, sowie bei der Auswertung der SBP-Inzidenz angewendet. Die Analyse inwieweit sich die Überlebenszeiten bzw. das Auftreten einer SBP im Hinblick auf das Risiko eines Ereignisses (Tod bzw. SBP) zwischen den Gruppen unterscheiden, erfolgte mittels Log-rank-Test. Eine Cox-Regression wurde zur Schätzung des Einflusses unabhängiger Variablen auf die Dauer bis zum Eintreten von Ereignissen durchgeführt. Eine Rechtszensierung erfolgte am Tag der Lebertransplantation oder am Tag des letzten Kontaktes (Überlebensanalyse) und im Falle der kumulativen SBP-Inzidenz Analyse zusätzlich bei Tod. Variablen die in der univariaten Analyse statistisch signifikant waren ($p \leq 0,05$) wurden anschließend in multivariaten Modellen analysiert.

Die Überprüfung der Genotyp-Häufigkeiten auf Konformität zum Hardy-Weinberg-Gesetz erfolgte mit der Webanwendung <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml> (Rodriguez et al. 2009) und für die Berechnung des exakten P-Wertes wurde folgende Webanwendung genutzt <https://www.cog-genomics.org/software/stats> (Chang et al. 2015).

Für die *in vitro* Daten wurde jeweils der Mittelwert aus Mehrfachmessungen der einzelnen Proben für die statistische Analyse verwendet. Die Daten wurden als Boxplot mit Median dargestellt. Der arithmetische Mittelwert wurde zusätzlich durch ein Kreuz gekennzeichnet. Die Längen der Antennen (Whisker) wurden durch den Maximal- und Minimalwert festgelegt. Die Untersuchung auf Unterschiede der zentralen Tendenz stetiger Variablen erfolgte mit dem Mann-Whitney *U*-Test (zweiseitig, Konfidenzintervall: 95%) zwischen zwei Gruppen und dem Kruskal-

Wallis-Test mit Dunn-Bonferroni-Tests als *post hoc*-Tests für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen. Testergebnisse mit einem Signifikanzwert von $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet. Es erfolgte keine Korrektur für multiples Testen.

Die statistische Auswertung der Patientendaten wurde mit IBM SPSS Statistics 24.0 (IBM Corp, Armonk, New York) durchgeführt, wie auch die Darstellung aller Kaplan-Meier-Analysen. Die Auswertung und Darstellung aller Messergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA).

5 Ergebnisse

5.1 In-Silico Analyse zur Auswahl geeigneter *Tag*SNPs und zur Definition des *TRAF6*-Haplotyps

In den Genotypdaten für das *TRAF6* Gen des internationalen HapMap Projektes der Ausgabe 28 (Phase II+III; CEU Population; Chromosom 11; Position 36.467.073-36.489.113; vorwärts Strang) („The International HapMap Project“ 2003) finden sich 57 SNPs. Darunter sind 19 häufige SNPs, mit einer Minor Allelfrequenz (MAF) ≥ 1 Prozent (Kruglyak und Nickerson 2001). Für die Auswahl geeigneter *Tag*SNPs wurden die Daten mit Haploview Version 4.2 (Barrett et al. 2005) ausgewertet. Individuen, für welche mehr als 50% der Genotypdaten fehlen, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Ein paarweiser Vergleich von SNPs wurde bis zu einer maximalen Distanz von 500 bp zugelassen. Weiterhin wurden SNPs mit einer Minor Allelfrequenz (MAF) kleiner als 0,05, einem Hardy-Weinberg *P*-Wert kleiner als 0,001 oder bei fehlenden Genotypdaten dieses SNPs bei mehr als 25% der Individuen ausgeschlossen. Die Analyse von *Linkage Disequilibrium* (LD) Blöcken erfolgte nach der Methode von Gabriel et al. (2002) und lieferte 2 Blöcke, innerhalb derer die SNPs im starken LD liegen (Abbildung 6, S. 48). Als *Tag*SNPs wurden NC_000011.10(*TRAF6*):g.36502062C>T(rs331457) für Block 1 und NC_000011.10 (*TRAF6*):g.36509193G>C (rs5030419) für Block 2 ausgewählt (Referenzsequenz: GRCh38.p7). Diese erfassten im paarweisen *Tagging* in 2 Tests 12 von 12 Allelen. Für diese Analyse wurden SNPs mit einem minimalen Determinationskoeffizienten von $R^2 \geq 0,8$ einbezogen (Carlson et al. 2004). Der mittlere maximale Determinationskoeffizient R^2 beträgt 0,984 für die gewählten SNPs. Laut Carlson et al. (2004) liegt bei $R^2 = 1$ perfektes LD vor. Somit ist die Genotypisierung für rs331457 und rs5030419 sehr gut geeignet um den *TRAF6*-Haplotyp zu definieren.

5.2 Reinheit der CD14⁺-Zellen nach Zell-Separation mittels MACS

Dargestellt sind die Ergebnisse einer exemplarischen Überprüfung der Reinheit der mithilfe MACS isolierten CD14⁺-Zellen aus EDTA-Blut von 5 gesunden Probanden. Der Anteil lebender CD14⁺-Zellen beträgt im Mittel 96%. Die Reinheit der lebenden CD14⁺-Zellen nach der MACS Zellseparation liegt im Mittel bei 99,3% (Abbildung 7, S.48).

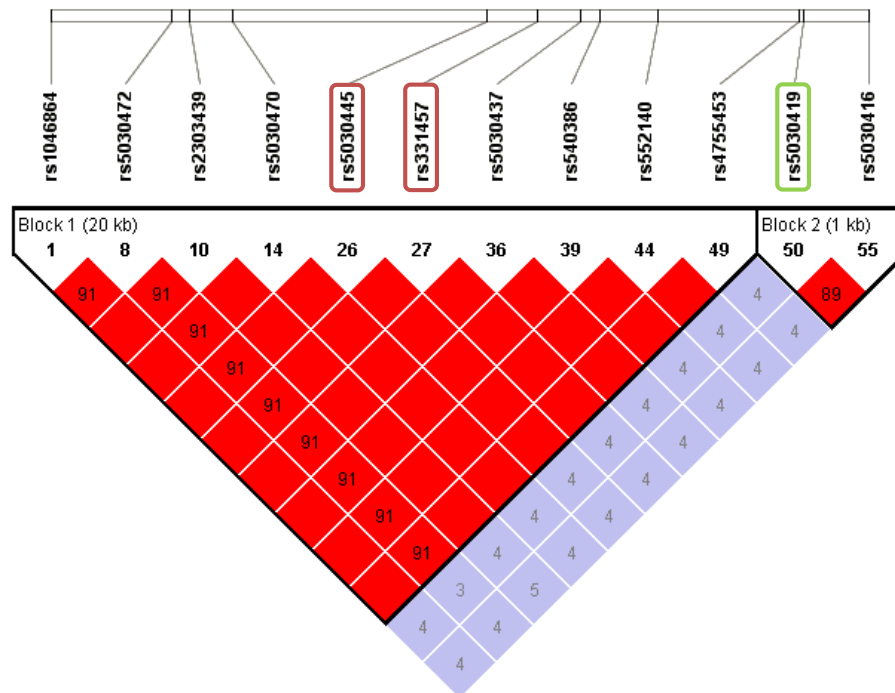


Abbildung 6: Linkage Disequilibrium (LD) Plot zur grafischen Veranschaulichung der TRAF6-Haplotypdefinition. R^2 Werte in Prozent. Grundlage der Abbildung sind Daten aus dem HapMap Projekt (HapMap Ausgabe 28 Phase II+III; CEU Population; Chromosom 11; Position 36.467.073-36.489.113; vorwärts Strang). Dargestellt sind alle SNPs mit einer MAF von mindestens 0,05 und einem Hardy Weinberg P -Wert von $\leq 0,001$.

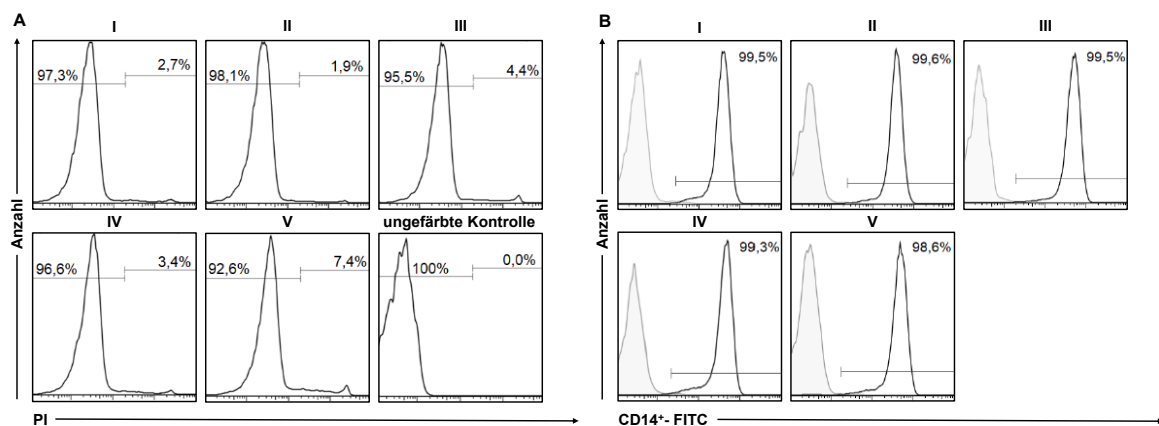


Abbildung 7: Reinheit der CD14⁺-Zellfraktion nach MACS-Separation. (A) Histogramm der Propidiumiodid (PI) -Färbung zur Differenzierung lebender und toter CD14⁺-Zellen, wobei nur tote Zellen eine PI-Färbung zeigen. (B) CD14⁺-Zellen wurden mit einem fluoreszenzmarkierten CD14-Fluorescein (FITC) Antikörper detektiert und zeigen ein positives Fluoreszenzsignal für Zellen, welche CD14 exprimieren. Im Histogramm sind nur lebende (PI-negative) Zellen dargestellt. Als Kontrolle ist die CD14 - negativ Fraktion (grau) im Vergleich zur CD14⁺-Fraktion (schwarz) abgebildet. Ein positives Fluoreszenzsignal lässt sich nur für die CD14⁺-Fraktion nachweisen.

5.3 Studienpopulation und Beobachtungszeit

In dieser kombiniert retrospektiv-prospektiven Studie wurden 432 hospitalisierte Patienten eingeschlossen, die aufgrund einer hydropisch dekompensierten Leberzirrhose eine Aszitespunktion erhielten. Vorrangig handelte es sich um männliche Patienten (71%) mit alkoholischer Leberzirrhose und einem medianen Alter von 59 Jahren (IQR: 52-68) zum Einschlusszeitpunkt (Tabelle 4, S. 50). Der Median des *Model for end-stage Liver Disease* (MELD) Scores lag bei 17 (IQR: 12-22) und weist auf eine fortgeschrittene Lebererkrankung hin. Insgesamt entwickelten 122 Patienten (28%) eine spontan bakterielle Peritonitis (SBP). Darunter 27 Patienten, die bereits vor Studieneinschluss an einer ersten gut dokumentierten SBP erkrankten und 95 Patienten welche diese zum Einschlussstag oder im Studienverlauf entwickelten. Während des Beobachtungszeitraumes starben insgesamt 201 Patienten (48%) nach einer medianen Studiendauer von 51 Tagen (IQR: 15-175). Es erhielten 36 Patienten (8%) eine Lebertransplantation nach einer medianen Zeit von 120 Tagen (IQR: 19-282). Nach Studienende lebten noch 195 Patienten ohne Transplantation. Die mediane Beobachtungszeit lag bei diesen Patienten bei 264 Tagen (IQR: 52-823). Eine antibiotische Primärprophylaxe der SBP mit Chinolonen, Cotrimoxazol oder Rifaximin erhielten 25 Patienten (6%) bereits zum Studieneinschluss und weitere 46 Patienten (11%) im Verlauf der Studie.

Tabelle 4: Patientencharakteristika der verschiedenen *TRAF6*-Haplotypen

rs331457 rs5030419	Alle Patienten (N=432)	Haplotyp 1 WT (CC) WT (CC) (N=208)	Haplotyp 2 MUT (CT/TT) WT (CC) (N=102)	Haplotyp 3 WT (CC) MUT (CG/GG) (N=103)	Haplotyp Mix MUT (CT/TT) MUT (CG/GG) (N=19)	P - Wert
Männer	308 (71%)	149 (72%)	68 (67%)	78 (76%)	13 (68%)	0.53
Alkoholische Zirrhose	325 (75%)	154 (74%)	79 (77%)	78 (76%)	14 (74%)	0.93
NOD2-Risikoallel	84 (19%)	43 (21%)	23 (23%)	17 (17%)	1 (5%)	0.29
Patientencharakteristika zum Einschluss						
Alter	59 (52-68)	60 (53-68)	58 (47-68)	59 (52-70)	56 (52-66)	0.43
Hepatozelluläres Karzinom	65 (15%)	33 (16%)	10 (10%)	18 (17%)	4 (21%)	0.30
Child-Pugh C	287 (66%)	140 (67%)	66 (65%)	70 (68%)	11 (58%)	0.80
MELD	17 (12-22)	17 (12-22)	18 (12-22)	17 (12-23)	14 (12-17)	0.30
Asziteszellen abs.(10 ⁹ Zellen/L)	0.20 (0.11-0.47)	0.20 (0.12-0.52)	0.18 (0.09-0.52)	0.21 (0.11-0.39)	0.19 (0.10-0.44)	0.77
Aszites PMN (10 ⁹ Zellen/L)	0.03 (0.02-0.23)	0.03 (0.02-0.22)	0.03 (0.02-0.34)	0.05 (0.02-0.14)	0.01 (0.01-0.04)	0.30
Aszites Protein (g/L)	13 (8-20)	13 (9-19)	10 (8-18)	11 (8-21)	21 (9-32)	0.03
SAAG	17 (13-20)	17 (13-20)	17 (13-20)	17 (12-21)	15 (12-15)	0.56
Bilirubin (µmol/L)	44 (22-97)	42 (21-98)	46 (26-92)	48 (20-114)	40 (24-64)	0.95
INR	1.4 (1.2-1.7)	1.4 (1.2-1.7)	1.4 (1.3-1.7)	1.4 (1.2-1.8)	1.4 (1.1-1.6)	0.76
Kreatinin (µmol/L)	96 (67-148)	90 (67-147)	108 (63-156)	106 (69-148)	81 (60-114)	0.41
CRP (mg/L)	32 (17-60)	32 (16-59)	37 (20-62)	33 (19-57)	22 (12-56)	0.68
Leukozyten (10 ⁹ Zellen/L)	7.2 (5.0-10.8)	7.0 (5.2-10.0)	6.9 (4.6-12.0)	8.0 (5.5-11.1)	5.7 (3.9-10.2)	0.46
Thrombozyten (10 ⁹ Zellen/L)	129 (82-185)	137 (87-200)	131 (78-185)	114 (79-181)	90 (69-144)	0.16
Albumin (g/L)	24 (20-28)	24 (20-29)	23 (20-28)	25 (20-28)	24 (20-31)	0.94
Natrium (mmol/L)	135 (132-139)	135 (131-138)	135 (132-138)	135 (133-139)	136 (132-141)	0.53
Beta-Blocker-Medikation	223 (52%)	100 (48%)	60 (59%)	53 (51%)	10 (53%)	0.36
Patientencharakteristika im Verlauf						
SBP jemals	122 (28%)	57 (27%)	40 (39%)	23 (22%)	2 (10%)	0.01
SBP-Rezidiv	20 (16%)	8 (14%)	7 (17%)	5 (22%)	0 (0%)	0.45
Primärprophylaxe	71 (17%)	34 (17%)	18 (19%)	17 (17%)	2 (10%)	0.89

5.4 TRAF6-Haplotypen

In dieser Arbeit wurden 432 Patienten für die SNPs (Referenzsequenz: GRCh38.p7) NC_000011.10(*TRAF6*):g.36502062C>T(rs331457) und NC_000011.10(*TRAF6*):g.36509193G>C(rs5030419) genotypisiert. Die Minor Allelfrequenzen (MAF) betrugen 0,16 (139/864 Allele) für rs331457 und 0,15 (126/864 Allele) für rs5030419. Die Überprüfung auf Konformität der beobachteten Genotypen-Häufigkeiten in der Studienpopulation mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz zeigte geringfügige Abweichungen für rs331457 und rs5030419 (Tabelle 5, S.52). Bei beiden SNPs handelte es sich um eine Punktmutation, für rs331457 um eine Transition von Cytosin durch Thymin (C > T) und für rs5030419 um eine Transversion von Cytosin durch Guanin (C > G). Aus der Kombination dieser 2 unabhängigen SNPs ließen sich 9 Haplotypen ableiten. Für die vereinfachte Betrachtung wurden alle Patienten mit mindestens einem seltenen Allel als Träger dieses SNPs betrachtet. Es ergaben sich 4 verschiedene Haplotypen in dieser Arbeit (Tabelle 6, S. 52):

- Haplotyp 1:
(HT1) Die Patienten trugen für beide Allele der analysierten SNPs die häufige Wildtyp-Variante (CCCC). Es handelte sich um den häufigsten Haplotyp in der Studienkohorte mit 208 (48%) Trägern.
- Haplotyp 2:
(HT2) Die Patienten trugen mindestens ein seltenes Allel des SNPs rs331457 und beide Wildtyp-Allele für rs5030419 (CTCC, TTCC). 102 (24%) der Patienten der Studie zeigten diesen Haplotyp 2.
- Haplotyp 3:
(HT3) Die Patienten trugen beide Wildtyp-Allele für rs331457 und mindestens ein Allel mit der seltenen Variante für den SNP rs5030419 (CCCG, CCGG). 103 (24%) der Patienten der Studie gehörten zu Haplotyp 3.
- Haplotyp Mix:
(HT M) Die Patienten trugen für beide SNPs mindestens ein seltenes Allel (CTCG, CTGG, TTCG, TTGG). Diese Gruppe stellt somit eine Mischung dar, aus einem spezifischen Haplotyp (beide SNPs auf demselben Chromosom) und der Mischung aus Haplotyp 2 und 3 (SNPs auf den zwei verschiedenen Chromosomen). 19 Patienten (4%) zählten in diese Gruppe. Sie waren alle heterozygot für beide SNPs (CTCG).

Tabelle 5: Konformität der Genotyp-Häufigkeiten der *TRAF6* SNPs rs331457 und rs5030419 in der Studienpopulation mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz

SNP	rs331457		rs5030519	
Genotyp	beobachtet	erwartet*	beobachtet	erwartet*
Wildtyp	311	304,18	310	315,19
Heterozygot	103	116,64	118	107,63
Mutiert	18	11,18	4	9,19
<i>P</i> -Wert (exakt)**	0,019533		0,052065	

*erwartete Genotyp-Häufigkeit nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz und berechnet nach Rodriguez et al. 2009;

**berechnet mit <https://www.cog-genomics.org/software/stats> (Chang et al. 2015)

Tabelle 6: *TRAF6*-Haplotypen

		rs5030419		
		Wildtyp (CC)	Heterozygot (CG)	Mutiert (GG)
rs331457	Wildtyp (CC)	208	99	4
	Heterozygot (CT)	84	19	0
	Mutiert (TT)	18	0	0

□ HT1; ■ HT2; □ HT3; ■ HT M

Zur Validierung der Haplotypen wurden alle Patienten für einen weiteren SNP, rs5030445, genotypisiert. Dieser Polymorphismus liegt im Intron 2 des *TRAF6* Gens innerhalb einer *Enhancer*-Region und im *Linkage Disequilibrium* (LD) mit rs331457 (Ward und Kellis 2012) (Abbildung 6, S. 48). In dieser Kohorte konnte das LD von rs5030445 mit rs331457 für 406 von 432 Patienten (94%) nachgewiesen werden. Die Qualität der schmelzkurvenbasierten Genotypisierung wurde mit der Sequenzierung der DNA von je 15 Patienten für rs331457 und rs5030419 validiert (Abbildung 8, S. 53). Es zeigte sich eine 100-prozentige Übereinstimmung der Genotypen zwischen beiden Methoden.

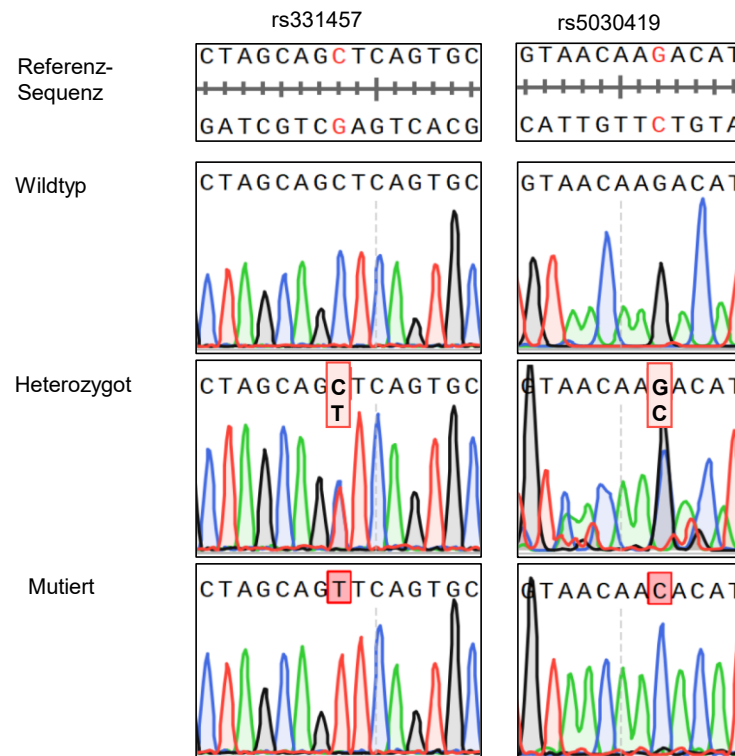


Abbildung 8: DNA-Sequenzalignment und Chromatogramm der Sanger-Sequenzierung zur Validierung der FRET-basierten Schmelzkurvenanalyse der *TRAF6* SNPs rs331457 und rs5030419.

5.5 *TRAF6*-Haplotypen und das Risiko einer spontan bakteriellen Peritonitis

Es zeigten sich keine Hinweise für statistisch signifikante Unterschiede zwischen den vier *TRAF6*-Haplotypgruppen für folgende Variablen zum Einschlusszeitpunkt (Tabelle 4, S. 50): Geschlecht, Alter, *NOD2*-Risikoallel, alkoholische Leberzirrhose, Hepatozelluläres Karzinom (HCC), Child-Pugh Stadium, Zellen im Aszites, Neutrophile im Aszites, Bilirubin, INR, Kreatinin, CRP, Leukozyten, Albumin, Natrium, Beta-Blocker-Medikation, antibiotische Primärprophylaxe. Insbesondere fanden sich keine Hinweise für Unterschiede im Schweregrad der Leberzirrhose und dem Auftreten von portaler Hypertension, welches durch die Surrogat Parameter MELD Score, Serum-Aszites-Albumin-Gradienten (SAAG) und die Thrombozytenkonzentration reflektiert wurde. Eine Ausnahme stellte die Aszites-Proteinkonzentration dar, welche für Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp Mix signifikant höher war als bei den Haplotypen 1 bis 3 ($P=0,03$).

Die kombiniert retro- und prospektive Analyse der SBP Häufigkeiten zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den vier *TRAF6*-Haplotypen (Tabelle 4, S. 50). Der Anteil der Patienten, welche jemals eine SBP entwickelten war in der Gruppe vom *TRAF6*-Haplotyp 2 mit 39 Prozent im Vergleich zu 25 Prozent bei Patienten der anderen Haplotypen (1; 3; M) am größten (Abbildung 9). Das relative Risiko für eine SBP lag bei 1,5. Für das Auftreten eines SBP-Rezidivs, trotz antibiotischer Sekundärprophylaxe, zeigten sich hingegen keine Unterschiede zwischen den vier *TRAF6*-Haplotypen. 347 Patienten hatten bis einschließlich dem Studieneinschluss tag keine SBP entwickelt. Diese wurden für die prospektive Kaplan-Meier Analyse zur Schätzung der kumulativen SBP-Inzidenz herangezogen. Die Analyse ergab eine kumulative Wahrscheinlichkeit von $16,3\% \pm 2,7\%$ (SEM) innerhalb eines Jahres erstmalig eine SBP zu entwickeln. Bei Patienten mit dem *TRAF6*-Haplotyp 2 lag die kumulative 1-Jahres SBP-Neuerkrankungsrate mit $24,2\% \pm 6,0\%$ (SEM) signifikant höher als bei Patienten der anderen *TRAF6*-Haplotypen ($13,8\% \pm 2,9\%$ (SEM); $P=0,026$ im Log-Rank Test) (Abbildung 10, S. 55). Die *Hazard Ratio* (HR) für eine erste SBP-Episode lag für *TRAF6*-Haplotyp 2 Patienten bei 2,09 (95%-KI: 1,08-4,07; $P=0,03$).

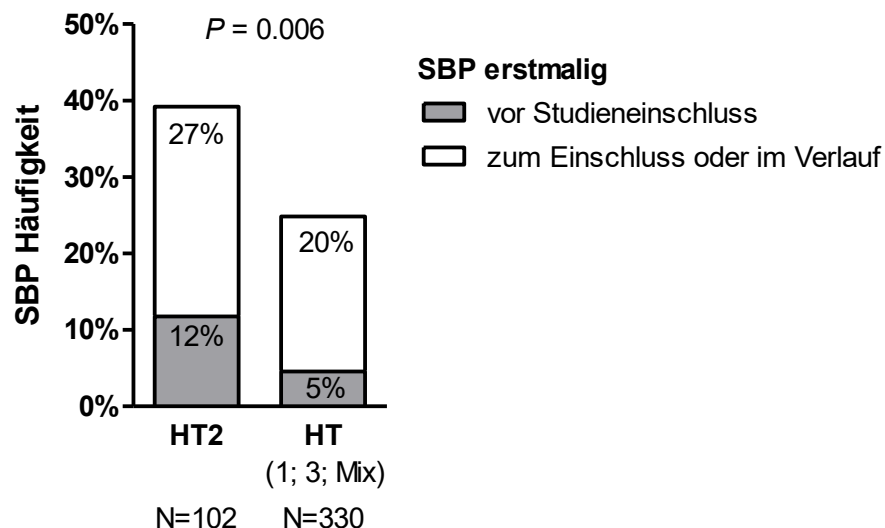
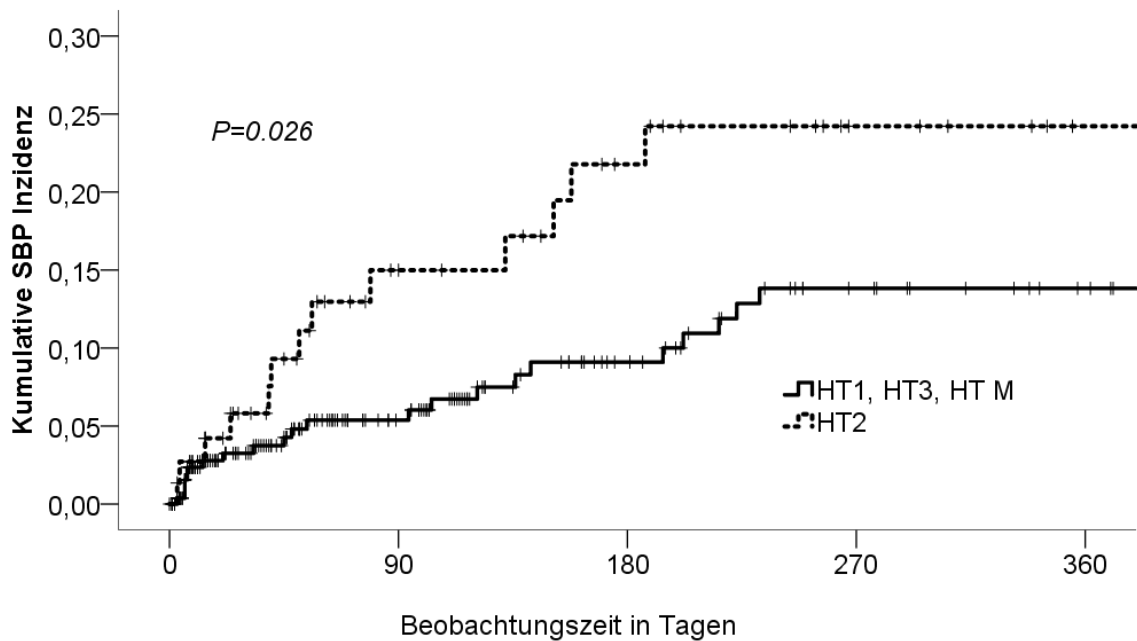


Abbildung 9: Vergleich der SBP Häufigkeit von Patienten mit dem *TRAF6*-Haplotyp 2 (HT2) gegen-über allen anderen *TRAF6*-Haplotypen (HT 1, 3, M). Zur Verdeutlichung des kombiniert retro- und prospektiven Studien-designs wurden die SBP Ereignisse nach ihrer erstmaligen Diagnose, entweder retrospektiv vor Studieneinschluss, wenn in den Patientenakten eindeutig dokumentiert, oder prospektiv zum Studieneinschluss beziehungsweise im Verlauf, untergliedert. Der *P*-Wert wurde mit dem exakten Test nach Fisher für die 2x2 Tabelle der kombiniert retro- und prospektiven Daten berechnet.



Patienten unter Risiko

TRAF6-Haplotyp	Beobachtungszeit in Tagen				
	0	90	180	270	360
HT1, HT3, HT M	271	145	103	83	74
HT2	76	40	32	23	18

Abbildung 10: Prospektive Analyse der ersten SBP-Episode. Dargestellt ist die kumulative Inzidenz der ersten SBP-Episode für alle 347 Patienten, welche bis einschließlich dem Studieneinschlusstag keine SBP entwickelt hatten. Die Daten wurden nach dem *TRAF6*-Haplotyp 2 stratifiziert. Eine Rechtszensur erfolgte bei Lebertransplantation, Tod oder beim *Loss to Follow-up*. Die Patientenanzahl unter Risiko ist in der Tabelle angegeben. Der *P*-Wert von 0,026 basiert auf dem Log-Rank Test.

Um die Assoziation zwischen dem *TRAF6*-Haplotyp 2 und dem Risiko, eine SBP zu entwickeln, abzuschätzen, wurde die Odds Ratio, das Chancenverhältnis, berechnet. Diese betrug 1,71 für Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp 2 im Vergleich zu Patienten mit dem *TRAF6*-Haplotyp 1 (95%-KI: 1,04-2,82; *P*-Wert=0,036). Beim Vergleich aller Patienten, also Träger (HT2) versus Nicht-Träger des *TRAF6*-Haplotyp 2 (HT1, HT3 und HT M), war die Odds Ratio mit 1,95 (95%-KI: 1,22-3,12; *P*-Wert=0,005) noch größer (Tabelle 7, S. 57). Neben dem *TRAF6*-Haplotyp wurden der *NOD2*-Genotyp, der MELD Score, die Serumalbumin-Konzentration, die Aszites-Proteinkonzentration, das Geschlecht, eine antibiotische Primärprophylaxe und die Einnahme von Beta-Blockern als weitere Risikofaktoren für die Entstehung einer SBP überprüft. Sowohl ein höherer MELD Score, als auch eine geringere

Serumalbumin-Konzentration wies in dieser Kohorte auf ein erhöhtes SBP-Risiko hin. Zur Klärung, inwiefern die unabhängigen Variablen *TRAF6*-Haplotyp 2, MELD Score und Serumalbumin-Konzentration mit der Wahrscheinlichkeit eine SBP zu entwickeln assoziiert sind, wurde eine multivariate binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Im Modell 1 erfolgte der Vergleich der *TRAF6*-Haplotypen zwischen Haplotyp 2 Trägern versus Nicht-HT2-Trägern (HT1, HT3, HT M) und im Modell 2 wurden alle 4 *TRAF6*-Haplotypen, mit Haplotyp 1 als Referenz, einbezogen. In beiden Modellen erwiesen sich der *TRAF6*-Haplotyp 2 und eine geringe Serumalbumin-Konzentration als unabhängige Risikofaktoren für eine SBP (Tabelle 7, S.57).

5.5.1 *TRAF6*-Haplotyp und SBP-Risiko für Patienten ohne Hepatozelluläres Karzinom

Das Vorliegen eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) ist mit einer erhöhten Mortalität und darüber mit einer kürzeren Beobachtungszeit, im Vergleich zu Patienten ohne HCC, verbunden (Tabelle 12, S. 63). Inwiefern das Vorliegen eines HCC die Assoziation des *TRAF6*-Haplotyps mit dem SBP-Risiko beeinflusst ist nicht geklärt. Der Anteil von Patienten mit HCC lag in dieser Kohorte bei 15% (Tabelle 4, S. 50). Zwischen den einzelnen *TRAF6*-Haplotypen gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Anteils an HCC-Patienten. In der Subgruppenanalyse für alle Patienten ohne HCC wurde ebenso ein erhöhtes SBP-Risiko bei Patienten mit dem *TRAF6*-Haplotyp 2 festgestellt. Die Odds Ratio lag im Vergleich zum *TRAF6*-Haplotyp 1 bei 1,73 (95%-KI: 1,02-2,94; $P=0,017$) und gegenüber allen Nicht-Trägern des *TRAF6*-Haplotyp 2 bei 2,08 (95%-KI:1,22-3,31; $P=0,008$). Genauso wie in der Gesamtkohorte zeichneten die *TRAF6*-Haplotypgruppen ein klinisch homogenes Bild ohne signifikante Unterschiede (Tabelle 8, S 58). Eine Ausnahme stellte auch hier die Aszites-Proteinkonzentration dar, welche bei *TRAF6*-Haplotyp Mix signifikant höher war als bei allen anderen *TRAF6*-Haplotypen ($P=0,011$).

Tabelle 7: Risikofaktoren für die erste Episode einer spontan bakteriellen Peritonitis

	Univariates Modell		Multivariates Modell 1 [#]		Multivariates Modell 2 [#]	
	OR (95% CI)	P-Wert	OR korrigiert (95% CI)	P-Wert	OR korrigiert (95% CI)	P-Wert
<i>TRAF6</i> Haplotyp 1 Haplotyp 2 Haplotyp 3 Haplotyp Mix	1.00 (Referenz) 1.71 (1.04-2.82) 0.76 (0.44-1.33) 0.38 (0.07-1.39)	0.016	nicht einbezogen	-	1.00 (Referenz) 1.77 (1.07-2.95) 0.78 (0.44-1.38) 0.35 (0.08-1.57)	0.018
<i>TRAF6</i> -Haplotyp 2*	1.95 (1.22-3.12)	0.005	2.00 (1.24-3.22)	0.004	nicht einbezogen	-
<i>NOD2</i> -Risikoallel	0.88 (0.51-1.51)	0.64	-	-	-	-
MELD Score (je 1-Punkt Zunahme)	1.03 (1.00-1.06)	0.046	1.03 (0.99-1.06)	0.11	1.02 (0.99-1.06)	0.12
Albumin (je 1 g/L Anstieg)	0.95 (0.92-0.99)	0.013	0.96 (0.92-0.99)	0.038-	0.96 (0.92-0.99)	0.039
Aszites-Protein (je 1 g/L Anstieg)	1.00 (0.98-1.02)	0.84	-	-	-	-
Männliches Geschlecht	1.00 (0.63-1.59)	1.00	-	-	-	-
Antibiotische Primärprophylaxe ##	0.64 (0.34-1.20)	0.17	-	-	-	-
Beta-Blocker-Medikation	1.00 (0.66-1.52)	1.00	-	-	-	-

Binär Logistische Regression mit 2 alternativen Modellen, wobei Modell 1 die *TRAF6*-Haplotyp 2 Träger gegenüber den Nicht-Haplotyp 2 Trägern betrachtet und Modell 2 alle *TRAF6*-Haplotypen, mit Haplotyp 1 als Referenz, einbezieht.

* *TRAF6*-Haplotyp 2 versus Nicht-HT2-Trägern HT1, HT3 und HT M

zusammengefasste Primärprophylaxe mit Chinolonen, Cotrimoxazol oder Rifaximin. Daten verfügbar von 421 Patienten (97,5%).

Tabelle 8: Patientencharakteristika der verschiedenen *TRAF6*-Haplotypen bei Patienten ohne HCC

rs331457 rs5030419	Alle Patienten (N=367)	Haplotyp 1 WT (CC) WT (CC) (N=175)	Haplotyp 2 MUT (CT/TT) WT (CC) (N=92)	Haplotyp 3 WT (CC) MUT (CG/GG) (N=85)	Haplotyp Mix MUT (CT/TT) MUT (CG/GG) (N=15)	P - Wert
Männliches Geschlecht	252 (69%)	118 (67%)	60 (65%)	62 (73%)	12 (80%)	0.56
Alkoholische Leberzirrhose	281 (77%)	131 (75%)	71 (77%)	66 (78%)	13 (87%)	0.82
NOD2-Risikoallel	73 (20%)	35 (20%)	21 (23%)	16 (19%)	1 (7%)	0.59
Patientencharakteristika zum Einschluss						
Alter	58 (51-68)	59 (53-68)	58 (47-67)	57 (50-69)	55 (52-65)	0.39
Child-Pugh C	241 (66%)	119 (68%)	60 (65%)	55 (65%)	7 (47%)	0.420
MELD	17 (12-22)	17 (12-22)	19 (12-22)	17 (12-23)	13 (11-17)	0.14
Aszites Zellen absolut (10 ⁹ Zellen/L)	0.20 (0.11-0.48)	0.21 (0.12-0.53)	0.18 (0.09-0.55)	0.20 (0.10-0.43)	0.19 (0.09-0.44)	0.70
Aszites PMN (10 ⁹ Zellen/L)	0.03 (0.02-0.26)	0.03 (0.02-0.27)	0.03 (0.02-0.36)	0.05 (0.02-0.16)	0.02 (0.01-0.04)	0.25
Aszites Protein (g/L)	13 (8-20)	14 (9-19)	10 (8-18)	11 (8-21)	22 (13-37)	0.011
SAAG	16 (12-20)	17 (13-19)	16 (13-20)	17 (11-21)	14 (11-16)	0.40
Bilirubin (μmol/L)	42 (21-97)	41 (21-100)	46 (25-91)	46 (17-115)	35 (23-56)	0.78
INR	1.5 (1.2-1.7)	1.5 (1.2-1.8)	1.4 (1.2-1.7)	1.5 (1.2-1.8)	1.3 (1.1-1.6)	0.39
Kreatinin (μmol/L)	97 (67-149)	90 (67-149)	104 (61-160)	105 (68-144)	82 (67-135)	0.76
CRP (mg/L)	32 (16-56)	31 (15-56)	37 (18-61)	32 (17-52)	28 (15-61)	0.85
Leukozyten (10 ⁹ Zellen/L)	7.4 (5.0-11.1)	7.1 (5.3-10.3)	7.0 (4.6-13.0)	8.9 (5.5-12.3)	5.7 (3.9-10.2)	0.31
Thrombozyten (10 ⁹ Zellen/L)	129 (83-187)	138 (87-199)	132 (81-189)	114 (79-183)	96 (66-173)	0.43
Albumin (g/L)	24 (20-29)	24 (20-28)	23 (20-28)	25 (20-29)	28 (19-35)	0.744
Natrium (mmol/L)	136 (132-139)	136 (131-139)	136 (132-138)	135 (132-139)	136 (132-141)	0.59
Beta-Blocker-Medikation	184 (50%)	79 (45%)	54 (59%)	43 (51%)	8 (53%)	0.21
Patientencharakteristika im Verlauf						
SBP jemals	106 (29%)	49 (28%)	37 (40%)	19 (22%)	1 (70%)	0.011
SBP-Rezidiv	18 (17%)	6 (12%)	7 (19%)	5 (26%)	0 (0%)	0.45
Primärprophylaxe	61 (17%)	28 (16%)	15 (17%)	16 (19%)	2 (13%)	0.94

5.5.2 *TRAF6*-Haplotyp und SBP-Risiko in Abhängigkeit der Ätiologie der Leberzirrhose

Die Analyse der Kohorte nach der Stratifizierung für die Ätiologie der Leberzirrhose zeigte, dass mit 75% der Großteil der Patienten (N=325) eine alkoholische Leberzirrhose aufwies. Weitere Ursachen waren chronisch virale Infektionen (N=22), Nichtalkoholische Fettleberhepatitis (NASH; N=6), Autoimmunerkrankungen (N=11) und sonstige (N=68). Eine statistisch aussagefähige Analyse zum Einfluss der Ätiologie auf das *TRAF6*-Haplotyp-assoziierte SBP-Risiko war aufgrund der geringen Fallzahlen in den nicht-alkoholischen Subgruppen nur für den Vergleich zwischen alkoholischer und nicht-alkoholischer Leberzirrhose möglich. Die Verteilung der *TRAF6*-Haplotypen unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 9). In beiden Subgruppen war der *TRAF6*-Haplotyp 2 als unabhängiger Risikofaktor mit einem signifikant erhöhten SBP-Risiko assoziiert (Tabelle 10, S. 60).

Tabelle 9: Verteilung der *TRAF6*-Haplotypen in den Subgruppen Alkoholische und Nicht-alkoholische Leberzirrhose

	Alkoholische Leberzirrhose	Nicht-alkoholische Leberzirrhose	P-Wert [#]
Alle Patienten	N=325	N=107	
<i>TRAF6</i> - Haplotyp 1	155 (47.7%)	53 (49.5%)	0.94
Haplotyp 2	79 (24.3%)	23 (21.5%)	
Haplotyp 3	77 (23.7%)	26 (24.3%)	
Haplotyp Mix	14 (4.3%)	5 (4.7%)	
Patienten mit SBP	N=84	N=38	
<i>TRAF6</i> - Haplotyp 1	40 (47.6%)	17 (44.7%)	0.94
Haplotyp 2	27 (32.1%)	13 (34.2%)	
Haplotyp 3	16 (19.0%)	7 (18.4%)	
Haplotyp Mix	1 (1.2%)	1 (2.6%)	

Angegeben wurde die absolute Patientenzahl und in Klammern der Anteil in Prozent,

[#]P-Wert wurde mit dem Exakten Test nach Fisher berechnet.

Tabelle 10: Risikofaktoren für eine SBP in den Ätiologie-Subgruppen

Univariates Modell	Alkoholische Leberzirrhose		Nicht-alkoholische Leberzirrhose	
	OR (95% CI)	P-Wert	OR (95% CI)	P-Wert
<i>TRAF6</i> Haplotyp 1 Haplotyp 2 Haplotyp 3 Haplotyp Mix	1.00 (reference) 1.49 (0.83-2.69) 0.75 (0.39-1.46) 0.22 (0.03-1.75)	0.12	1.00 (reference) 2.75 (1.01-7.53) 0.78 (0.28-2.21) 0.58 (0.06-5.10)	0.12
<i>TRAF6</i> -Haplotyp 2*	1.72 (0.99-2.99)	0.053	3.07 (1.19-7.92)	0.020
<i>NOD2</i> -Risikoallele	0.90 (0.48-1.69)	0.74	0.89 (0.31-2.60)	0.83
MELD Score (je 1-Punkt Zunahme)	1.04 (1.00-1.07)	0.058	1.03 (0.97-1.08)	0.34
Albumin (je 1 g/L Anstieg)	0.99 (0.96-1.02)	0.61	1.00 (0.97-1.03)	0.84
Aszites-Protein (je 1 g/L Anstieg)	0.96 (0.92-1.01)	0.09	0.90 (0.83-0.97)	0.004
Männliches Geschlecht	1.44 (0.78-2.67)	0.25	0.68 (0.31-1.52)	0.35
Antibiotische Primärprophylaxe	0.62 (0.29-1.34)	0.22	0.67 (0.22-2.06)	0.49
Beta-Blocker-Medikation	1.01 (0.61-1.66)	0.97	0.90 (0.40-1.99)	0.79
Multivariates Modell	OR (95% CI)	P-Wert	OR (95% CI)	P-Wert
<i>TRAF6</i> -Haplotyp 2*	1.81 (1.04-3.17)	0.037	3.04 (1.11-8.36)	0.031
MELD (je 1-Punkt Zunahme)	1.03 (0.99-1.07)	0.14	1.03 (0.97-1.09)	0.30
Aszites Protein (je 1-g/L Anstieg)	0.97 (0.92-1.02)	0.21	0.90 (0.83-0.97)	0.005

* *TRAF6*-Haplotyp 2 versus Nicht-*HT2*-Trägern *HT1*, *HT3* und *HT M*

5.5.3 *TRAF6*-Haplotyp und SBP-Risiko in Abhängigkeit des *NOD2*-Genotyps

Die genetischen Varianten NC_000016.10(*NOD2*):g.50712015C>T(rs2066844), NC_000016.10(*NOD2*):g.50722629G>C(rs2066845) und NC_000016.10(*NOD2*):g.50729867_50729868insC(rs2066847) im *NOD2*-Gen waren in früheren Studien mit einem erhöhten SBP-Risiko assoziiert, insbesondere bei mikrobiologisch positivem Kulturergebnis des Aszites (Appenrodt et al. 2010, Bruns et al. 2012a, Lutz et al. 2015). Da *TRAF6* ein nachgeschaltetes Signalmolekül bei der *NOD2* vermittelten Immunantworten ist, war die Frage zu klären, inwiefern genetische Varianten von *NOD2* sich auf das mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziierte SBP-Risiko

auswirken. In dieser Studienkohorte waren 84 Patienten (19%) Träger eines *NOD2*-Risikoallels (Tabelle 4, S. 50). Davon zählten 43 Patienten zum *TRAF6*-Haplotyp 1, 23 zum *TRAF6*-Haplotyp 2, 17 zum *TRAF6*-Haplotyp 3 und 1 Patient zum *TRAF6*-Haplotyp Mix. Eine SBP entwickelten 22 Patienten mit *NOD2*-Risikoallel. In dieser Kohorte konnten die *NOD2*-Risikoallele nicht als unabhängige Risikofaktoren für eine SBP bestätigt werden (Tabelle 7, S. 57). Auch in der Subgruppenanalyse entsprechend des mikrobiologischen Kulturergebnisses stellten die *NOD2*-Risikoallele keinen unabhängigen Risikofaktor für die Ausprägung einer SBP dar, der *TRAF6*-Haplotyp 2 hingegen schon (Tabelle 11, S. 62). Die gekoppelte Betrachtung von *TRAF6*-Haplotyp und *NOD2*-Genotyp ergab eine Assoziation des *TRAF6*-Haplotyps mit dem SBP-Risiko für Patienten ohne *NOD2*-Risikoallel ($P=0,005$), nicht jedoch für Träger mindestens eines der 3 analysierten *NOD2*-Risikoallele ($P=0,59$) (Abbildung 11).

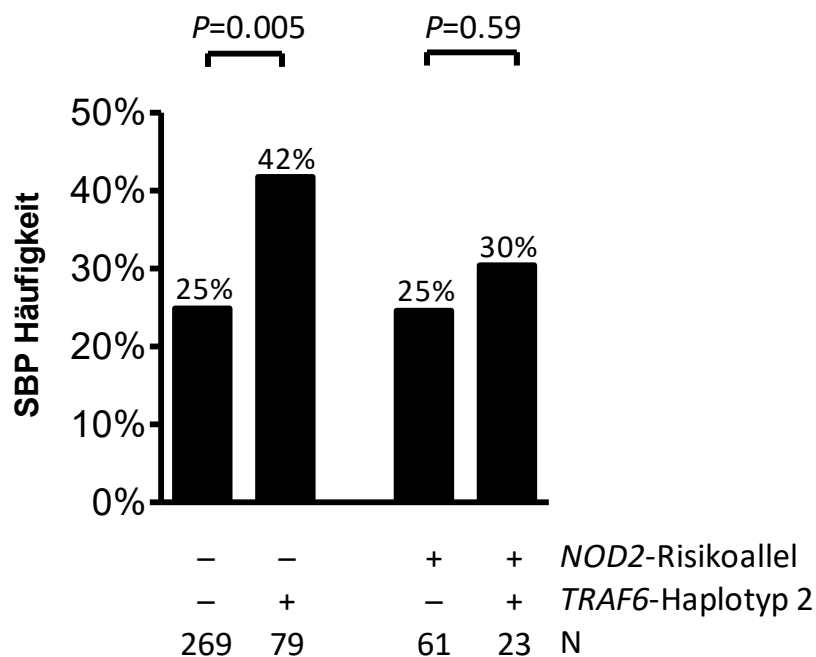


Abbildung 11: Gekoppelte Analyse des *TRAF6*-Haplotyps und des *NOD2*-Genotyps als genetische Risikofaktoren auf die SBP Häufigkeit. Es wurde die SBP Häufigkeit von Patienten mit *TRAF6*-Haplotyp 2 mit allen anderen *TRAF6*-Haplotypen in den 2 Subgruppen, Träger der *NOD2*-Risikoallele und *NOD2*-Wildtyp-Träger verglichen. Der P -Wert wurde mit dem Exakten Test nach Fisher berechnet.

Tabelle 11: Risikofaktoren für eine SBP in Abhängigkeit des mikrobiologischen Kulturergebnisses

Univariates Modell	mikrobiologisch negative Kultur		mikrobiologisch positive Kultur	
	OR (95% CI)	P-Wert	OR (95% CI)	P-Wert
<i>TRAF6</i>				
Haplotyp 1	1.00 (Referenz)		1.00 (Referenz)	
Haplotyp 2	1.72 (0.94-3.13)	0.09	1.69 (0.84-3.42)	0.14
Haplotyp 3	0.83 (0.43-1.62)		0.66 (0.28-1.53)	
Haplotyp Mix	0.26 (0.03-2.03)		0.39 (0.05-3.04)	
<i>TRAF6</i> -Haplotyp 2*	1.92 (1.10-3.36)	0.023	2.00 (1.03-3.88)	0.04
<i>NOD2</i> - Risikoallel	0.93 (0.49-1.78)	0.83	0.80 (0.36-1.80)	0.56
MELD Score (je 1-Punkt Zunahme)	1.01 (0.87-1.05)	0.68	1.06 (1.02-1.10)	0.004
Albumin (je 1 g/L Anstieg)	0.96 (0.92-1.01)	0.11	0.94 (0.89-0.99)	0.027
Aszites-Protein (je 1 g/L Anstieg)	1.1 (0.98-1.03)	0.60	0.98 (0.95-1.02)	0.30
Männliches Geschlecht	1.02 (0.58-1.78)	0.96	0.98 (0.50-1.91)	0.95
Antibiotische Primärprophylaxe	0.60 (0.27-1.33)	0.21	0.70 (0.28-1.74)	0.44
Beta-Blocker-Medikation	0.71 (0.43-1.19)	0.20	1.71 (0.91-3.22)	0.10
Multivariates Modell	OR (95% CI)	P-Wert	OR (95% CI)	P-Wert
<i>TRAF6</i> -Haplotyp 2*	2.01 (1.14-3.55)	0.016	2.08 (1.05-4.10)	0.04
<i>NOD2</i> -Risikoallel	0.86 (0.44-1.68)	0.66	0.72 (0.31-1.67)	0.45
MELD (je 1-Punkt Zunahme)	1.00 (0.96-1.04)	0.91	1.06 (1.01-1.10)	0.009
Aszites Protein (je 1-g/L Anstieg)	0.97 (0.92-1.01)	0.13	0.96 (0.90-1.01)	0.10

**TRAF6*-Haplotyp 2 versus Nicht-HT2-Trägern HT1, HT3 und HT M

5.6 Klinische Präsentation der *TRAF6*-Haplotypen während der ersten SBP Episode

Zur Klärung der Frage inwiefern der *TRAF6*-Haplotyp sich auf das Erscheinungsbild der ersten SBP Episode auswirkt, wurden die klinisch relevanten Parameter analysiert. Insgesamt 122 Patienten zeigten mindestens eine SBP Episode, darunter 27 Patienten mit ihrer ersten SBP Episode vor Studieneinschluss.

Aufgrund der Fallzahlen (Tabelle 4, S. 50) und des höchsten SBP-Risikos bei *TRAF6*-Haplotyp 2 gegenüber allen anderen *TRAF6*-Haplotypen (Tabelle 7, S. 57) erfolgte der Vergleich zwischen Trägern und Nicht-Trägern des *TRAF6*-Haplotyp 2 (Tabelle 13, S. 64). Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, für das Patientenalter, das mikrobiologische Kulturergebnis, und für das Organversagen. Augenscheinlich verlief die Infektion für Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp 2 inflammatorisch milder als für Patienten der *TRAF6*-Haplotypen 1, 3, M. So waren die medianen Konzentrationen von CRP und Leukozyten bei Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp 2 im Vergleich zu den *TRAF6*-Haplotypen 1, 3 und M geringer. Ebenso überlebten mehr Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp 2 die ersten 28 Tage nach der Infektion. Bei dem zu Grunde gelegten Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ verfehlten die Analysen jedoch die statistische Signifikanz, da $P > 0,05$. Die Cox-Regressionsanalyse identifizierte ein hohes Alter bei Studieneinschluss, eine fortgeschrittene Lebererkrankung, repräsentiert durch einen hohen MELD Score, die Diagnose eines hepatozellulären Karzinoms sowie die Diagnose einer SBP als unabhängige Prädiktoren für die Überlebenszeit der Patienten in der Gesamtkohorte (Tabelle 12).

Tabelle 12: Prädiktoren für die Überlebenszeit

	Hazard Ratio (95% KI)	P-Wert
(a) Univariates Cox-Regressionsmodell		
Alter (je 1-Jahr Anstieg)	1.03 (1.02–1.05)	<0.001
Männliches Geschlecht	1.07 (0.79–1.44)	0.68
Child-Pugh C*	1.70 (1.24–2.32)	<0.001
MELD (je 1 Punkt Zunahme)	1.06 (1.04–1.08)	<0.001
Hepatozelluläres Karzinom*	2.42 (1.72–3.41)	<0.001
SBP jemals	1.54 (1.15–2.06)	0.004
<i>NOD2</i> - Risikoallel	0.94 (0.66–1.35)	0.75
<i>TRAF6</i> -Haplotyp 2	0.82 (0.59–1.15)	0.26
Beta-Blocker-Medikation	0.93 (0.70–1.23)	0.93
(b) Multivariates Cox-Regressionsmodell		
Alter (je 1-Jahr Anstieg)	1.04 (1.02–1.05)	<0.001
Child-Pugh C*	vom Modell ausgeschlossen	n.s.
MELD (je 1 Punkt Zunahme)	1.07 (1.05–1.09)	<0.001
Hepatozelluläres Karzinom*	2.43 (1.71–3.46)	<0.001
SBP jemals	1.67 (1.25–2.24)	<0.001

* Zum Studieneinschluss

Tabelle 13: Charakteristika der ersten SBP-Episode entsprechend des *TRAF6*-Haplotyps

	TRAF6-Haplotyp 2 (N=40)	TRAF6-Haplotyp 1, 3, Mix (N=82)	P-Wert
Männliches Geschlecht	26 (65%)	61 (74%)	0.29
Alter bei SBP (Jahre)	61 (48-68)	57 (51-65)	0.46
Aszites PMN (10 ⁹ Zellen/L)	1.3 (0.5-4.3)	0.9 (0.4-2.3)	0.14
Bilirubin (µmol/L)	53 (28-100)	52 (23-144)	0.78
INR	1.4 (1.2-1.8)	1.5 (1.3-2.0)	0.24
CRP (mg/l)	50 (27-108)	84 (36-128)	0.11
Leukozyten (×10 ⁹ Zellen/L)	8.9 (4.5-13.6)	9.9 (6.9-16.6)	0.10
Nosokomiale SBP	21 (58%)	42 (52%)	0.55
Mikrobiologisches Kulturergebnis			
Kultur-negativ	23 (58%)	51 (62%)	0.38
Gram-negativ	7 (18%)	13 (16%)	
Gram-positiv	6 (15%)	16 (20%)	
Beide	1 (3%)	1 (1%)	
Fehlende Daten	3 (8%)	1 (1%)	
Nierenversagen bei Diagnose der SBP			
Nein	25 (63%)	51 (62%)	0.84
Ja	10 (25%)	23 (28%)	
Fehlende Daten	5 (13%)	8 (10%)	
Ausgang 28 Tage nach SBP Diagnose			
Überlebende	33 (83%)	48 (59%)	0.06
Verstorbene	7 (18%)	28 (34%)	
Lebertransplantation	0 (0%)	3 (4%)	
Loss to Follow-up	0 (0%)	3 (4%)	
Kaplan-Meier Schätzer ± Standardfehler (SEM)	83 ± 6%	65 ± 5%	0.06

5.7 Funktionelle Konsequenzen des *TRAF6*-Haplotyps für die peritoneale und systemische Immunität

Zur Überprüfung inwiefern der *TRAF6*-Haplotyp 2 mit der Funktion von Peritonealmakrophagen im Aszites und darüber hinaus Monozyten im Blut assoziiert ist, wurden sowohl Analysen von sterilem, nicht-neutrozytischem Aszites und Blutserum als auch *In vitro* Versuche mit isolierten Peritonealmakrophagen und Monozyten vorgenommen.

5.7.1 Die Assoziation des *TRAF6*-Haplotyps mit zirkulierenden Entzündungsmarker in Aszites und Blutserum unter nicht-inflammatorischen Bedingungen

Für eine umfassendere phänotypische Charakterisierung der *TRAF6*-Haplotypen, welche über die klinische Laborroutine hinausgeht, wurden weitere Entzündungsmarker im Aszites und Blutserum mittels ELISA bestimmt (4.4.8, S. 44). Als Marker akuter Inflammation wurden Interleukin-6 (IL-6) als pro-inflammatorisches Zytokin, CXCL8 als Vertreter der Chemokine, Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP) als Akut-Phase-Protein, sowie lösliches CD163 (sCD163) als Makrophagen-Aktivierungsmarker und lösliches CD87 (suPAR) als Immunzell-Aktivierungsmarker ausgewählt. Die Analyse zeigte eine signifikant geringere suPAR-Konzentration im Aszites bei Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp 2 gegenüber allen anderen *TRAF6*-Haplotypen 1, 3, M ($P=0,04$). Für alle weiteren analysierten Marker, einschließlich der suPAR-Konzentration im Blutserum, konnten keine Assoziationen mit dem *TRAF6*-Haplotyp festgestellt werden (Abbildung 12 A-H, S. 66).

5.7.2 Auswirkungen des *TRAF6*-Haplotyps auf den zellulären Immunstatus von Peritonealmakrophagen und Monozyten

Infolge rekurrenter pathologischer bakterieller Translokation sind sowohl residierende Makrophagen der Peritonealhöhle, wie auch zirkulierende Monozyten im Blut, wiederholt PAMPs und DAMPs ausgesetzt. Zur Charakterisierung der zellulären Reaktion auf diese Form der kontinuierlichen Stimulation wurde die mRNA Expression von *IL6*, *CXCL8*, *TNF*, *IL1B*, *IL10* und *CD80* in Peritonealmakrophagen und Monozyten (Abbildung 13, A-L, S. 66/68) bestimmt. Zusätzlich wurde die mRNA Expression von *TNFAIP3* und *TNIP1*, zwei *TRAF6*-Antagonisten (Boone et al. 2004, Mauro et al. 2006), analysiert (Abbildung 13, M-P, S. 68). Dabei war lediglich die Expression von (mRNA)*IL6* und (mRNA)*CXCL8* in Peritonealmakrophagen mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert. Beide Zytokine waren in Peritonealmakrophagen der Patienten mit dem *TRAF6*-Haplotyp 2 gegenüber allen anderen *TRAF6*-Haplotypen 1, 3, M (*IL6*: $P=0,05$; *CXCL8*: $P=0,01$) statistisch signifikant vermindert exprimiert. Auch für (mRNA)*IL1B* und (mRNA)*CD80* zeichnete sich bei Peritonealmakrophagen eine, jedoch statistisch nicht signifikante, geringere Expression bei Patienten mit dem *TRAF6*-Haplotyp 2 ab.

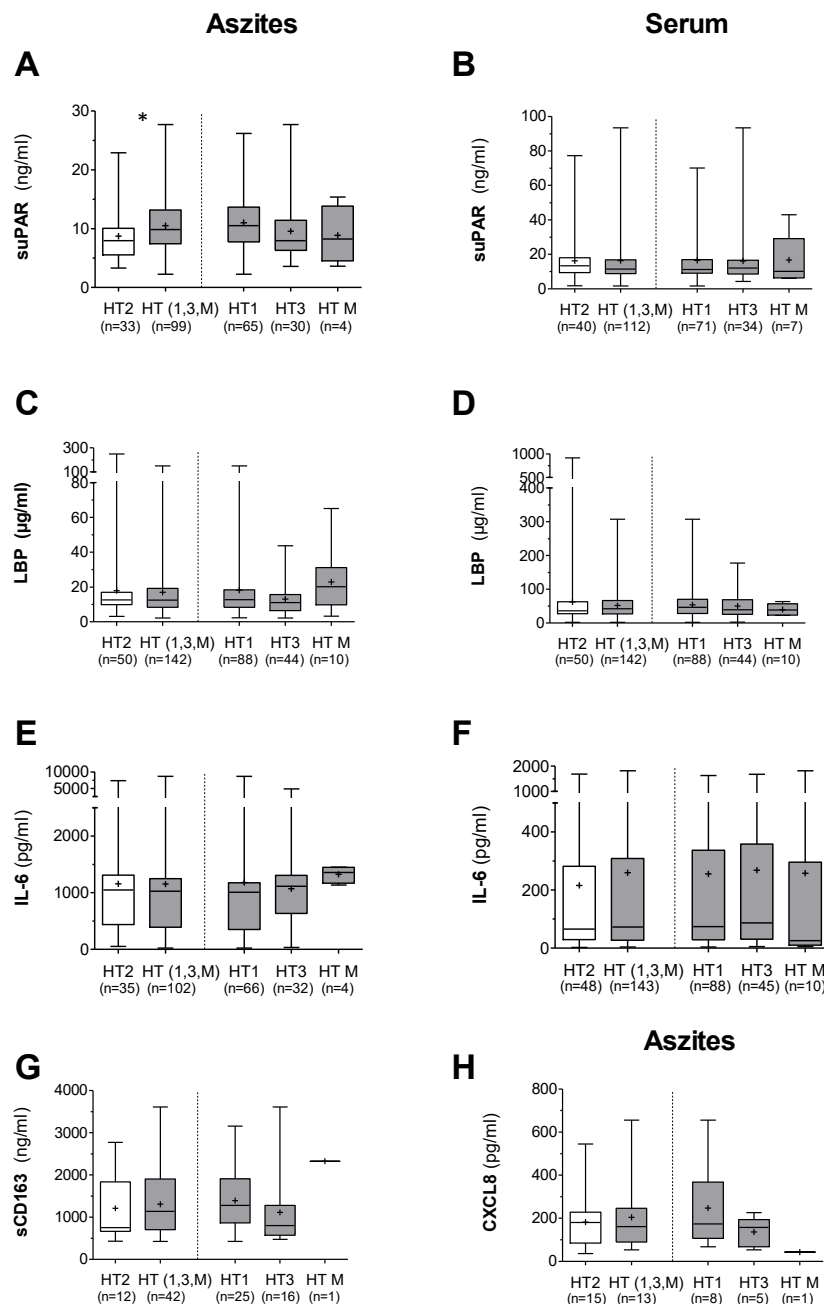
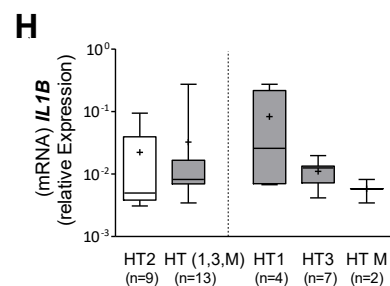
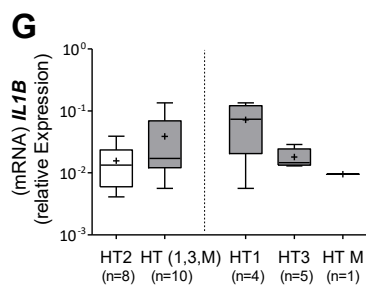
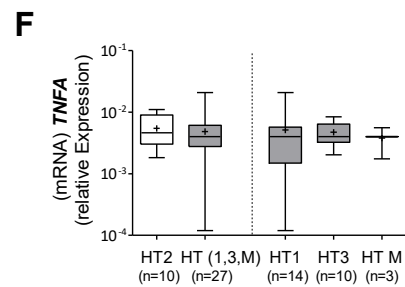
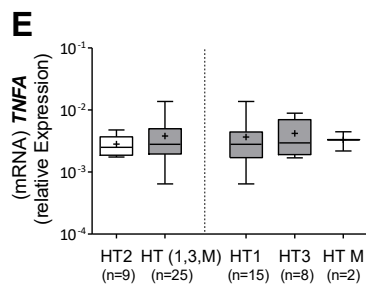
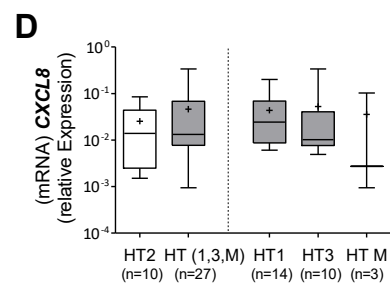
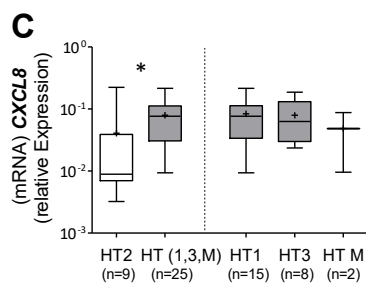
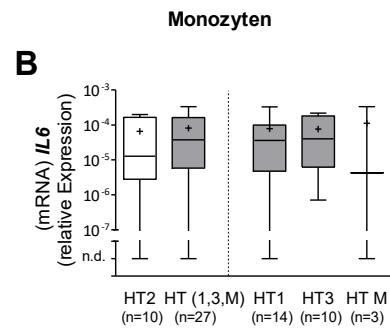
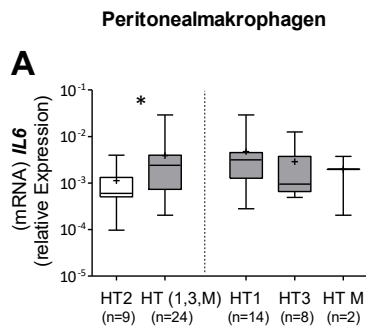


Abbildung 12: Die Assoziation des *TRAF6*-Haplotyps mit Entzündungsmarkern in nicht infiziertem Aszites und Blutserum.

(A) Die Konzentration an löslichem Urokinase-Plasminogen-Aktivator Rezeptor (suPAR) in Aszites ist signifikant geringer bei Trägern des *TRAF6*-Haplotyps 2 gegenüber allen Nicht-Trägern ($P=0,04$). (B-H) Die Konzentrationen von suPAR, Lipopolysaccharid-Binde-Protein (LBP) und Interleukin-6 (IL-6) im Serum, sowie die Konzentrationen von LBP, IL-6, löslichem CD163 und CXCL8 im Aszites zeigen keine Unterschiede zwischen den *TRAF6*-Haplotypen.

* statistisch signifikanter Unterschied ($P \leq 0,05$) berechnet mit dem Mann-Whitney U-Test.



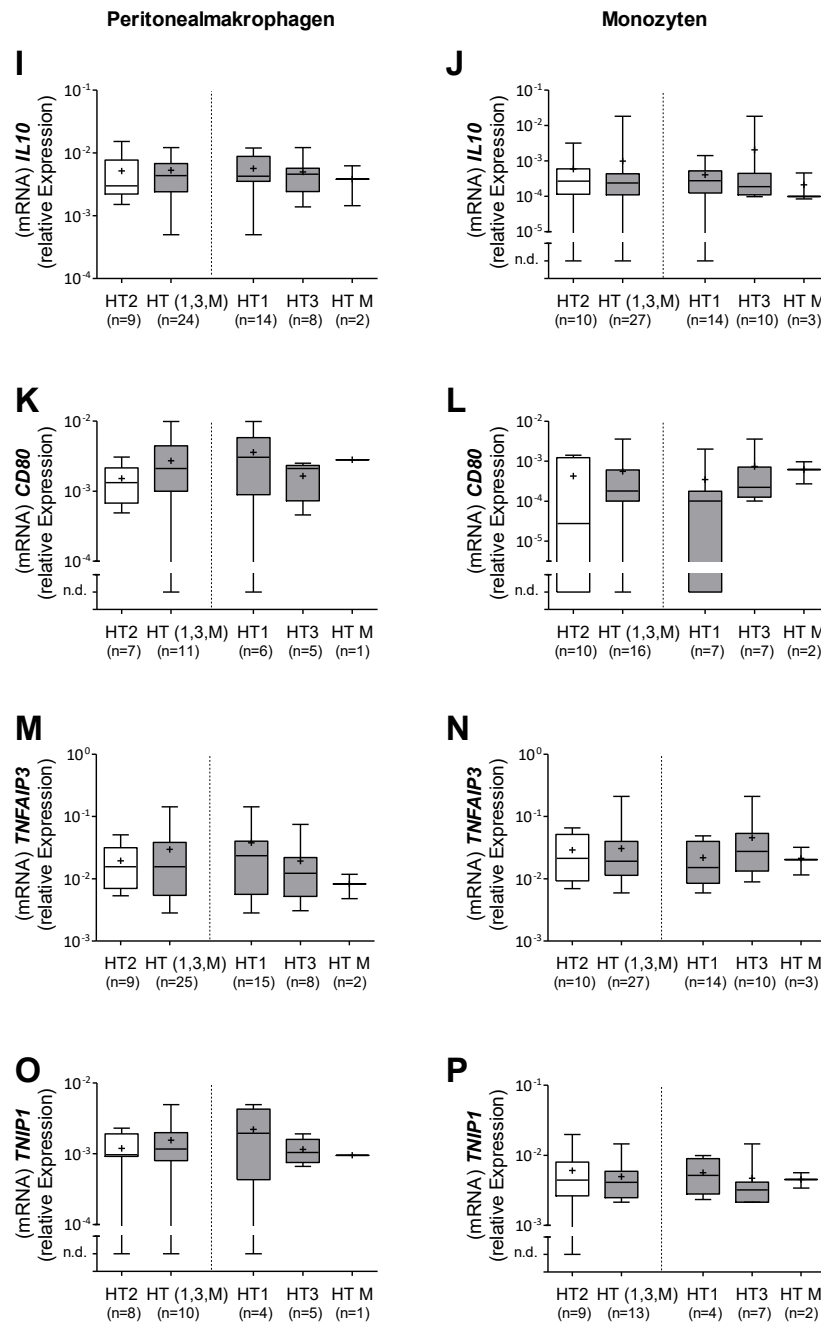


Abbildung 13: Konsequenzen des *TRAF6*-Haplotyps für Peritonealmakrophagen und zirkulierende Monozyten bei kontinuierlicher Immunaktivierung durch bakterielle Translokation. Eine signifikant verminderte basale mRNA Expression von (A) *IL6* und (C) *CXCL8* bei Patienten des *TRAF6*-Haplotyp 2 gegenüber allen anderen Patienten konnte in Peritonealmakrophagen, nicht aber in zirkulierenden Monozyten (B, D), gezeigt werden. Die mRNA Expression weiterer *TRAF6*-induzierbarer Zytokine, wie (E, F) *TNFA*, (G, H) *IL1B*, (I, J) *IL10* und (K, L) *CD80*, zeigte keine Assoziation mit dem *TRAF6*-Haplotyp. Ebenso war die mRNA Expression der *TRAF6*-Antagonisten (M, N) *TNFAIP3* und (O, P) *TNIP1* nicht mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert.

* statistisch signifikanter Unterschied ($P \leq 0,05$) berechnet mit dem Mann-Whitney U-Test.

Zur Klärung, inwiefern der *TRAF6*-Haplotyp mit der TRAF6-vermittelten Signaltransduktion bei Peritonealmakrophagen unter nicht-inflammatorischen Bedingungen assoziiert ist, wurde die Proteinexpression der aktivierten MAP-Kinasen p38, ERK und JNK mit Hilfe von Western Blots bei 15 Patienten, davon 4 Patienten mit dem *TRAF6*-Haplotyp 2 (Abbildung 14, Spalte 1-4), analysiert (4.4.6, S. 42). Zusätzlich wurde die Konzentration der aktivierten p65 Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Proteinextrakten der Nuclei von Peritonealmakrophagen bestimmt (4.4.7, S. 44). Dabei zeigte sich keine Assoziation zwischen dem *TRAF6*-Haplotyp und der Proteinexpression, sowie der Proteinaktivierung für p38, ERK, JNK und NF- κ B (Abbildung 14; Abbildung 15, A-D, S. 70).

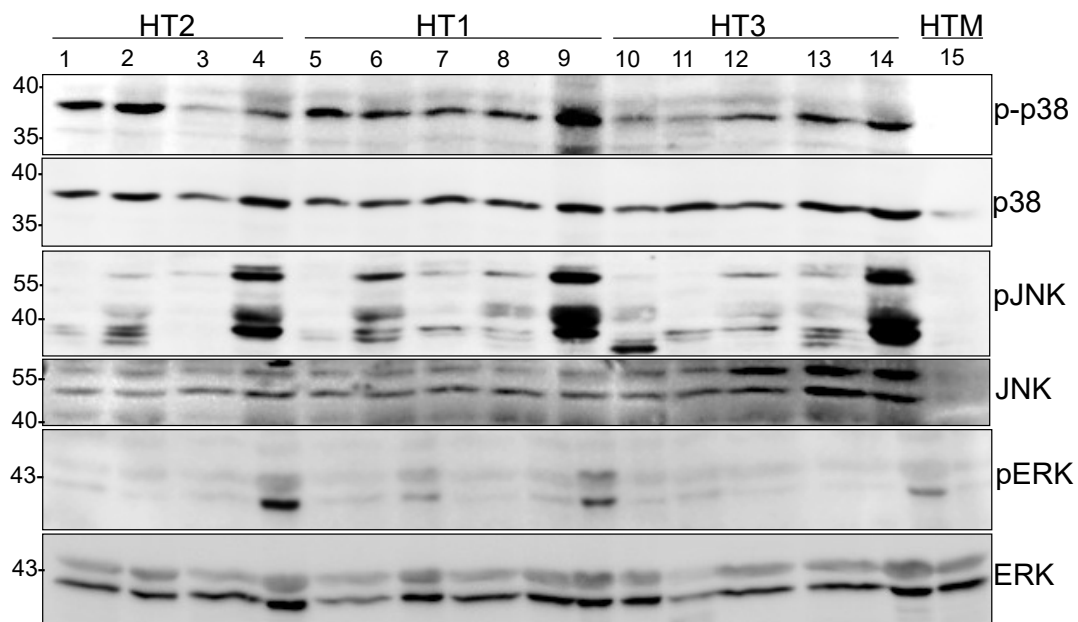


Abbildung 14: Die Bedeutung des *TRAF6*-Haplotyps für die Aktivierung der TLR-4-*TRAF6*-Signalkaskade. Repräsentativer Western Blot für die phosphorylierten und die Gesamtproteinlevel von p38, JNK und ERK bei 15 verschiedenen Patienten(1-15). Links sind die Größen des Proteinstandards in Kilodalton (kDa) markiert.

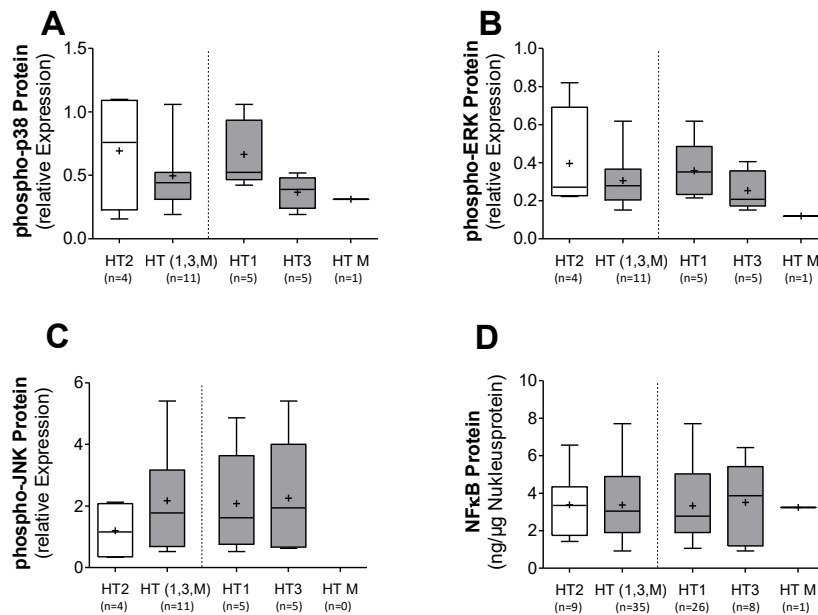


Abbildung 15: Die Bedeutung des *TRAF6*-Haplotyps für die Aktivierung der TLR-4-*TRAF6*-Signalkaskade. (A-C) Infolge großer individueller Expressionsunterschiede erfolgte eine densitometrische Analyse der Western Blots aus Abbildung 14 (S. 69) zur Quantifizierung. Dies ermöglichte die statistische Auswertung der Western Blots für die *TRAF6*-Haplotypen. Dargestellt wurde die phosphorylierte Proteinexpression relativ zum entsprechenden Gesamtproteinlevel. **(D)** Die Konzentration aktiver p65 Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF-κB wurde in Nukleusextrakten von Peritonealmakrophagen bestimmt und auf die Gesamtnukleus-Proteinkonzentration normiert.

5.7.3 Die *ex vivo* Zellaktivierung ist nicht mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert

Peritonealmakrophagen wiesen für *TRAF6*-Haplotyp 2 eine signifikant verminderte mRNA Expression der Zytokine *CXCL8* und *IL-6* auf. Im Aszites fanden wir eine geringere suPAR-Konzentration bei Patienten des *TRAF6*-Haplotyps 2. Inwiefern diese basal bestehenden Unterschiede des Immunstatus bei einer SBP zum Tragen kommen, sollte im Zellkulturmodell untersucht werden. Hierfür wurden Peritonealmakrophagen und Monozyten von Patienten, ohne Infektion des Aszites, *ex vivo* mit LPS stimuliert und das Potential zur *CXCL8*, *IL-6* und suPAR Sekretion nach 24 Stunden bestimmt.

Peritonealmakrophagen der Patienten mit dem *TRAF6*-Haplotyp 2 sezernierten numerisch weniger *CXCL8* (Abbildung 16 A, S. 71) im Vergleich zu Peritonealmakrophagen der Patienten mit dem *TRAF6*-Haplotypen 1, 3 oder M. Dieser Unterschied erreichte bei der statistischen Analyse mit dem definierten Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ jedoch keine statistische Signifikanz. Die Sekretion von *IL-6*, durch Peritonealmakrophagen (Abbildung 16 C, S. 71), wie auch

Monozyten (Abbildung 16 D, S. 71), und die Sekretion von suPAR (Abbildung 16 B, S. 71) waren nicht mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert.

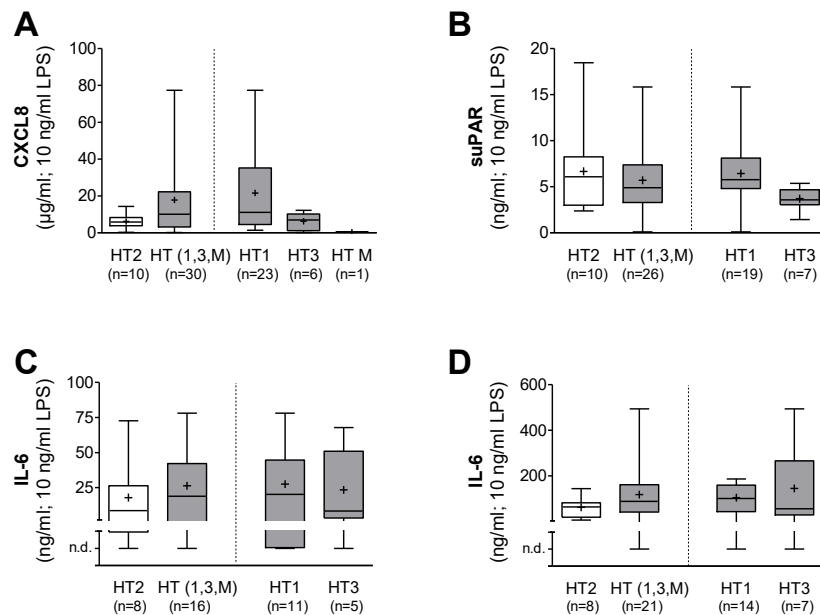


Abbildung 16: Ex vivo Zellaktivierung von (A, B, D) Peritonealmakrophagen und (C) Monozyten mit 10 ng/ml LPS. Die Konzentration sekretierter Proteine wurde nach 24 Stunden Kultur mit ELISA im Zellkulturüberstand für (A) CXCL8, (B) suPAR und (C, D) IL-6 bestimmt.

5.7.4 Die Bedeutung des *TRAF6*-Haplotyps für die *TRAF6* Expression in Peritonealmakrophagen und Monozyten

Zur Klärung inwiefern der *TRAF6*-Haplotyp mit der *TRAF6* Genexpression assoziiert ist, wurde die mRNA Expression von *TRAF6* (4.4.3, S. 38) sowie der 2 bekannten *TRAF6*-Spleißvarianten mittels qRT-PCR (4.4.4, S. 40) in Peritonealmakrophagen und Monozyten von Patienten untersucht. Ebenso wurde die Proteinexpression von *TRAF6* in Peritonealmakrophagen analysiert. Dies erfolgte mittels Western Blot unmittelbar nach der Zellextraktion oder nach 24 Stunden Kultivierung ex vivo, ohne und mit Stimulation durch LPS, Pam3CSK4 oder CpG (4.4.6, S. 42).

Die (mRNA)*TRAF6* Expression in Peritonealmakrophagen und in Monozyten zeigte keine Assoziation zum *TRAF6*-Haplotyp (Abbildung 17 A/B, S. 72). Die Analyse der beiden bekannten *TRAF6*-Spleißvarianten zeigte eine generell geringere (mRNA)*TRAF6_v2* Expression der gegenüber (mRNA)*TRAF6_v1*. Das Verhältnis des mRNA-Gehaltes zwischen beiden Spleißvarianten war nicht mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert (Abbildung 17 C/D, S. 72). Bei der Expressionsanalyse des

TRAF6-Proteins zeigten sich keine Unterschiede zwischen den *TRAF6*-Haplotypen, weder unbehandelt noch nach Stimulation (Abbildung 18; Abbildung 19, S. 73).

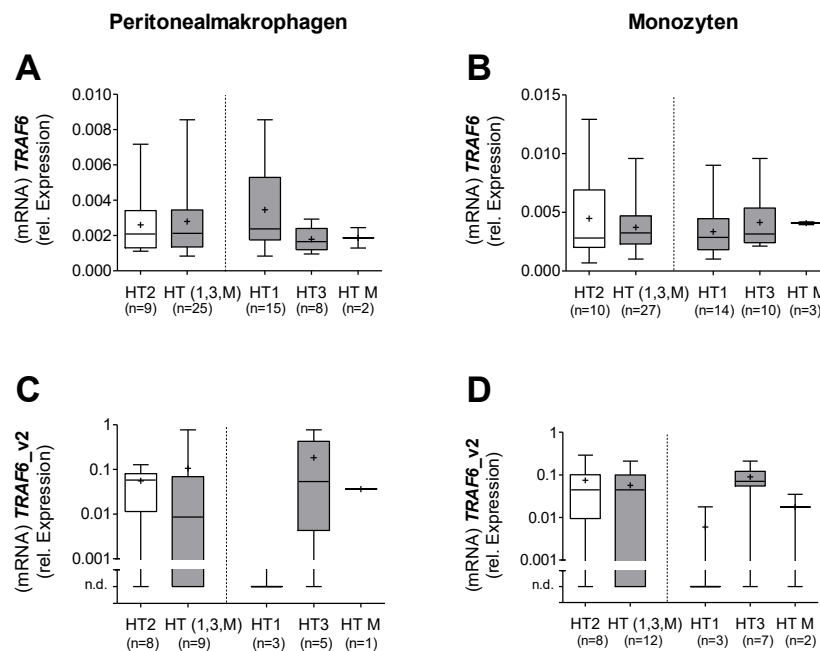


Abbildung 17: mRNA Expression von *TRAF6* und seinen Spleißvarianten bei Patienten mit Leberzirrhose. Die *TRAF6* mRNA Expression relativ zum β -Aktin Gehalt zeigt keine Assoziation mit dem *TRAF6*-Haplotyp in frisch isolierten Peritonealmakrophagen (A) und Monozyten (B) von Patienten mit Leberzirrhose. (C) und (D) zeigen die mRNA Expression der *TRAF6* Spleißvariante 2 relativ zur mRNA Expression der *TRAF6* Spleißvariante 1. Es wurden keine Assoziationen zum *TRAF6*-Haplotyp bei Peritonealmakrophagen (C) und Monozyten (D) nachgewiesen.

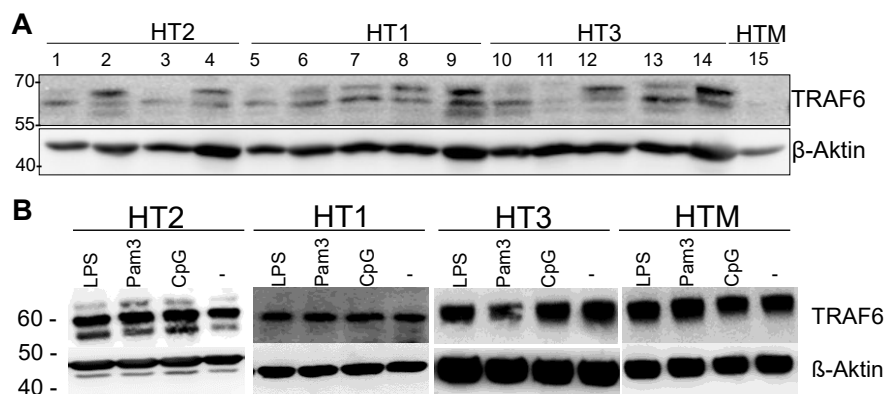


Abbildung 18: TRAF6 Proteinexpression in Peritonealmakrophagen

Die repräsentativen Western Blot Bilder zeigen keine Assoziation zwischen dem *TRAF6*-Haplotyp und der *TRAF6* Proteinexpression in (A) frisch isolierten Peritonealmakrophagen von 15 verschiedenen Patienten (1-15) und (B) nach 24 Stunden Kultivierung. Für jeden *TRAF6*-Haplotyp sind die repräsentativen Ergebnisse eines Patienten dargestellt. In Abbildung 19 (S. 73) sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse der Western Blots für alle untersuchten Patienten dargestellt. Die in der Zellkultur durchgeführte Stimulation mit LPS, Pam3CSK4 oder CpG zeigte keinen Einfluss auf die *TRAF6* Proteinexpression. Am linken Bildrand ist der Proteingrößenstandard in kDa angegeben.

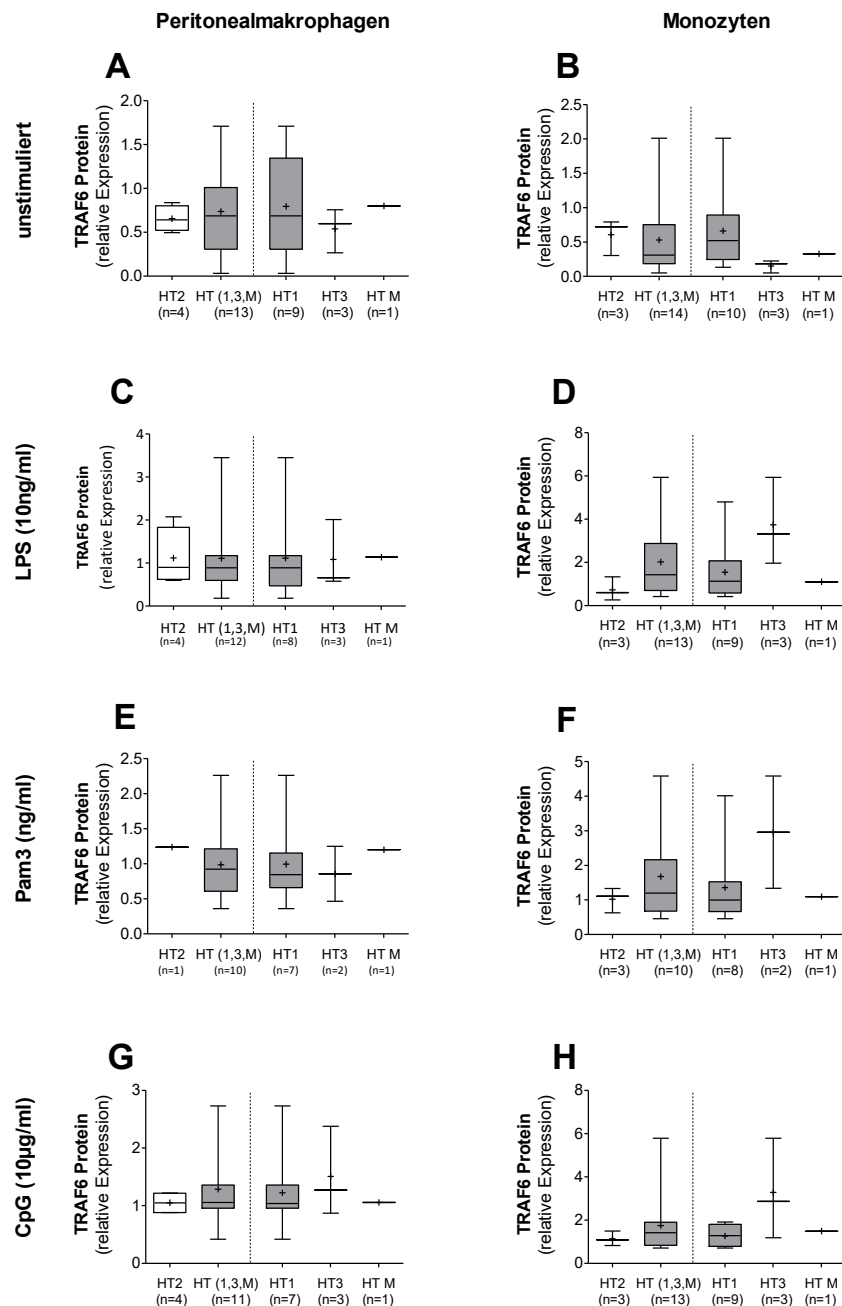


Abbildung 19: TRAF6 Proteinexpression in Peritonealmakrophagen (A, C, E, G) und Monozyten (B, D, F, G). Dargestellt sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse der Western Blots mit ImageJ. Die TRAF6 Proteinexpression wurde relativ zum jeweiligen β -Aktin Gehalt betrachtet. Für den Vergleich zwischen verschiedenen Membranen wurde zusätzlich, auf die bei jedem Blot mitgeführten Proteinextrakte der Zelllinie BT497, normalisiert. Die Darstellung der Proteinexpression nach 24 Stunden Stimulation mit 10 ng/ml LPS (C,D), 0,5 μ g/ml Pam3CSK4 (E,F) oder 10 μ g/ml CpG (G, H) erfolgte relativ zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle.

Zudem wurde die mRNA Expression des benachbarten *PRR5L*-Genes in Peritonealmakrophagen analysiert. Nach 24 Stunden Zellkultur zeigte der *PRR5L* mRNA Gehalt keine Assoziation mit dem *TRAF6*-Haplotyp, sowohl in unbehandelten Zellen wie auch in LPS behandelten Zellen (10 ng/ml). Dabei zeigten LPS stimulierte Zellen eine geringere *PRR5L* mRNA Expression als die unbehandelten Kontrollen (Abbildung 20).

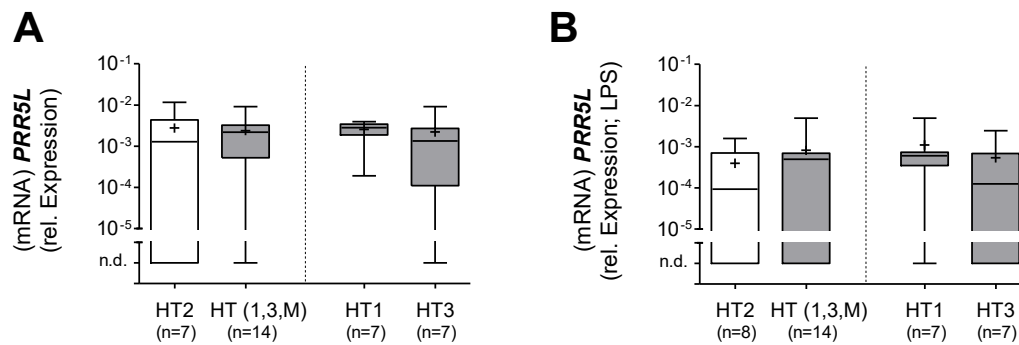


Abbildung 20: Die *PRR5L* mRNA Expression in Peritonealmakrophagen nach 24 Stunden Zellkultur ohne Stimulation (**A**) und mit 10 ng/ml LPS (**B**) zeigte keine Assoziation mit dem *TRAF6*-Haplotyp. Die Expressionsdaten wurden auf den jeweiligen (mRNA)*ACTB* Gehalt normalisiert.

5.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Diese Arbeit zeigt erstmals die Assoziation von *TRAF6* SNPs mit dem SBP-Risiko und dem klinisch-entzündlichen Phänotyp der SBP in einer großen Studie von 432 Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose. Die funktionellen Analysen in Monozyten und Peritonealmakrophagen untermauern die Assoziation dieser *TRAF6* SNPs mit dem entzündlichen Status.

Es wurden vier *TRAF6*-Haplotypen identifiziert, von denen *TRAF6*-Haplotyp 2 ein signifikant erhöhtes SBP-Risiko im Vergleich zum Wildtyp *TRAF6*-Haplotyp 1 (OR 1,71; 95%-KI 1,04-2,82; $P=0,016$) sowie zu allen anderen *TRAF6*-Haplotypen (OR 1,95; 95%-KI 1,22-3,12; $P=0,005$) aufwies. Diese starke Assoziation konnte mit einer prospektiven Sensitivitätsanalyse und zusätzlich in einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse unter Beachtung möglicher Drittvariablen bestätigt werden. Da der *TRAF6*-Haplotyp 2 bei einem Viertel der Patienten vorliegt, handelt es sich um einen häufigen und damit bedeutsamen Risikofaktor für Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose. Das mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziierte SBP-Risiko beeinflusste die Mortalität jedoch nicht.

Bei Patienten mit sterilem, nicht-neutrozytischen Aszites zeichneten sich Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp 2 durch einen geringeren pro-entzündlichen Immunstatus der Peritonealmakrophagen aus. Dies zeigte sich vor allem in einer signifikant geringeren suPAR-Konzentration im Aszites, einem löslichen Marker für peritoneale und systemische Aktivierung (Zimmermann et al. 2013). Zusätzlich war die basale Expression von Zytokinen reduziert, insbesondere das für die Rekrutierung von Neutrophilen verantwortliche Chemokin CXCL8 und das pro-entzündliche Interleukin-6 (IL-6). Untersuchungen in der vorgelagerten Signalkaskade gaben keinen Hinweis auf die kausale Wirkung der *TRAF6* SNPs. So waren weder die *TRAF6* Expression selbst (mRNA, Protein) noch die Expression der *TRAF6*-Antagonisten *TNFAIP3* und *TNIP1* mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert. Folglich konnte auch für die aktivierten MAP Kinasen p38, JNK und ERK sowie der aktivierten p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B keine Assoziation mit dem *TRAF6*-Haplotyp nachgewiesen werden. Interessanterweise war die *TRAF6*-Haplotyp assoziierte Immunmodulation auf Peritonealmakrophagen beschränkt und lies sich innerhalb der systemischen Zirkulation bei Monozyten nicht bestätigen.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse für *TRAF6*-Haplotyp 2 im Vergleich zu allen anderen *TRAF6*-Haplotypen (1, 3, M)

	Peritonealhöhle	Systemische Zirkulation
Proteinkonzentration	Aszites	Serum
suPAR	↓ ($P=0,04$)	↔
LBP	↔	↔
IL-6	↔	↔
sCD163	↔	—
CXCL8	↔	—
mRNA Expression	Peritonealmakrophagen	Monozyten
<i>TRAF6</i>	↔	↔
<i>TRAF6</i> Spleißvariante 2	↔	↔
<i>TNFAIP3</i>	↔	↔
<i>TNIP1</i>	↔	↔
<i>IL6</i>	↓ ($P=0,05$)	↔
<i>CXCL8</i>	↓ ($P=0,01$)	↔
<i>TNFA</i>	↔	↔
<i>IL1B</i>	↓	↓
<i>IL10</i>	↔	↔
<i>CD80</i>	↔	↔
Proteinexpression	Peritonealmakrophagen	Monozyten
<i>TRAF6</i>	↔	—
Phospho-p38	↔	—
Phospho-ERK	↔	—
Phospho-JNK	↔	—
NF-κB p65 Untereinheit	↔	—
Proteinsekretion ex vivo nach TLR-4-Stimulation	Peritonealmakrophagen	Monozyten
IL-6	↔	—
CXCL8	↓	—
suPAR	↔	—

Symbolbedeutung: ↓ vermindert; ↔ vergleichbar; — nicht bestimmt

6 Diskussion

6.1 Studienkollektiv

Die spontan bakterielle Peritonitis (SBP) ist eine häufige und vor allem schwerwiegende Komplikation bei Patienten mit Aszites. In 75% der Fälle liegt diesem eine dekompensierte Leberzirrhose mit portaler Hypertension zu Grunde (EASL 2010). Zur Analyse genetischer Risikofaktoren, welche mit der Entwicklung einer SBP verbunden sind, ist daher ein Studienkollektiv von Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose besonders geeignet. In der hier vorgelegten Arbeit wurden 432 Patienten mit diagnostizierter Leberzirrhose, punktionswürdigem Aszites und fortgeschrittener Lebererkrankung, indiziert durch einen medianen MELD Score von 17, eingeschlossen. Andere Studien, die genetische Faktoren mit dem SBP-Risiko assoziieren konnten, hatten ein ähnliches Patientenkollektiv hinsichtlich des Schweregrades der Leberzirrhose (medianer MELD zwischen 16-17), dem Anteil alkoholisch bedingter Leberzirrhose (57%-76%), des medianen Alters (56-61) und des relativen Anteils von SBP-Ereignissen (17-39%). Die Größen dieser Studienkohorten waren vergleichsweise klein mit 88-175 eingeschlossenen Patienten. (Gäbele et al. 2009, Appenrodt et al. 2010, Nischalke et al. 2011, Bruns et al. 2012a, 2012b, Dinya et al. 2018). Die Studie von Lutz et al. (2015) zur Assoziation eines NDP52 Polymorphismus mit dem SBP-Risiko, hatte mit 350 eingeschlossenen Patienten das bisher größte Kollektiv. Einschränkend wurden die Patienten jedoch aufgeteilt in die Derivations- (N=152) und Validierungskohorte (N=198). Somit stellt unsere Studie das bisher größte Patientenkollektiv für die Analyse genetischer Risikofaktoren einer SBP bei Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose dar. Im Vergleich zu großen GWAS, deren Genotyp-Phänotyp-Assoziationen bereits bestätigt werden konnten, ist diese Studie mit 432 Patienten verhältnismäßig klein. So wurden in den initialen Studien zur Assoziation der NOD2 Polymorphismen mit Morbus Crohn mehr als 700 Personen (Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001) eingeschlossen und für die Assoziation des *Transcription factor 7-like 2 gene* (TCF7L2) mit Diabetes mellitus Typ 2 wurden initial 2 Populationen, 767 Dänen und 891 US-Amerikaner (Grant et al. 2006) untersucht und in entsprechenden Replikationskohorten sogar mehr als 6500 Individuen (Groves et al. 2006, Saxena et al. 2006) analysiert.

Die beobachteten Genotyphäufigkeiten für rs331457 und rs5030419 weichen geringfügig von den, nachdem Hardy-Weinberg-Gesetz zu erwartenden Häufigkeiten ab. Genotypisierungsfehler als Ursache für diese Abweichungen konnten durch zwei unabhängige Validierungsmethoden ausgeschlossen werden. Die Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gesetzes erfordert eine ideale Population mit unendlich großer Individuenzahl, bei der weder Selektion, Mutation oder Migration auftritt. Inwiefern diese reale Studienkohorte von einer idealen Population abweicht, lässt sich nur schwer abschätzen. Am wahrscheinlichsten scheint die Ursache jedoch in der geringen Individuenzahl begründet zu sein. (Zintzaras 2010). Die Minor Allelfrequenzen (MAF) der *TRAF6*-Haplotyp SNPs mit 0,16 für rs331457 und 0,15 für rs5030419 sind mit den beobachteten MAF in der gesunden europäischen Population mit 0,13 (0,10-0,16) für rs331457 und 0,15 (0,11-0,21) für rs5030419 vergleichbar (McVean et al. 2012). Somit stellt der *TRAF6*-Haplotyp keinen Risikofaktor für die Entwicklung einer Leberzirrhose per se dar und die Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sind vernachlässigbar. Die Assoziation mit dem SBP-Risiko wurde eindeutig nachgewiesen. Interessanterweise bewirkten die beiden analysierten SNPs gegenteilige Effekte. Während *TRAF6*-Haplotyp 2 mit einem signifikant erhöhten SBP-Risiko einherging, war das SBP-Risiko von Patienten der *TRAF6*-Haplotypen 3 und M gegenüber des Wildtyps (*TRAF6*-Haplotyp 1) reduziert. Da in dieser Studie die Auswirkungen und zugrunde liegenden Ursachen eines erhöhten SBP-Risikos im Fokus standen, wurde das Hauptaugenmerk auf den Vergleich von *TRAF6*-Haplotyp 2 und allen anderen *TRAF6*-Haplotypen (1, 3, M), welche hierfür als einheitliche Gruppe betrachtet wurden, gerichtet.

6.2 Das kombiniert retro-und prospektive Studiendesign und seine Limitationen

Die mediane transplantationsfreie Beobachtungszeit betrug 264 Tage nach Studieneinschluss. Dies ist ausreichend lang, wenn man beachtet, dass bereits zwei Drittel der Patienten zum Einschlusszeitpunkt dem Child-Pugh Stadium C angehörten und deren Ein-Jahres-Überlebensrate mit 45% im Vergleich zu 61% bei Patienten mit Erstdekompensation bereits deutlich verringert ist (D'Amico et al.

2006). Durch das kombiniert retro- und prospektive Studiendesign konnte die gesamte Zeit unter SBP-Risiko, ab Erstdekompensation bis zum Studienende, abgebildet werden. Die retrospektive Betrachtung verlängerte so den Gesamtbeobachtungszeitraum, über die mediane Beobachtungszeit hinaus und ermöglichte so den Einschluss einer relevanten Patientenanzahl in einer relativ kurzen Zeit. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Patienten mit vorausgegangener SBP aufgrund fehlender/nicht zugänglicher Dokumentation nicht erhoben werden konnten. Zudem waren die Daten einer vor Studieneinschluss stattgehabten ersten SBP-Episode nicht immer vollständig. Um diesem Informationsbias vorzubeugen, wäre es idealer, Patienten bei Erstdekompensation einzuschließen und anschließend rein prospektiv bezüglich der Entwicklung einer SBP zu beobachten. Dies ließe jedoch eine deutlich längere Studiendauer erwarten.

6.3 Der *TRAF6*-Haplotyp ist signifikant mit dem Risiko für eine spontan bakterielle Peritonitis im Kontext einer hydropisch dekompensierten Leberzirrhose assoziiert

Während der Beobachtungszeit entwickelten 39 Prozent der Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp 2 mindestens eine SBP-Episode, wohingegen dies bei nur 25 % der Patienten mit den *TRAF6*-Haplotypen 1, 3 und M geschah. Die Bestimmung des Chancenverhältnisses (OR: 1,95; 95%-KI: 1,22-3,12) dieser beiden Gruppen, bestätigte ein signifikant erhöhtes SBP-Risiko bei Patienten des *TRAF6*-Haplotyp 2 ($P=0,005$). Abgesehen vom SBP-Risiko, zeigten die Studiengruppen eine homogene Struktur und einen vergleichbaren klinischen Phänotyp. Der Schweregrad der Leberzirrhose, bewertet durch die Surrogatparameter MELD-Score, Child-Pugh Score, SAAG und der Thrombozytenkonzentration, war zwischen den Gruppen vergleichbar. Auch für demographische Daten, wie Alter, Geschlecht und die Ätiologie der Leberzirrhose, konnten keine Unterschiede zwischen den *TRAF6*-Haplotypen festgestellt werden. Ebenso erhielt eine über die Gruppen vergleichbare Patientenanzahl eine antibiotische Primärprophylaxe und der systemische Immunstatus (WBC, CRP) zeigte keine Differenzen. Lediglich die Konzentration des Gesamtproteins im Aszites variierte zwischen den Gruppen signifikant ($P=0,029$), wobei dies durch sehr hohe Werte in der Gruppe des seltenen

TRAF6-Haplotyp Mix begründet war. Eine schwerere portale Hypertension als Ursache dafür konnte durch den Vergleich der SAAG Werte ausgeschlossen werden. Zudem stellt eine geringe Aszitesprotein-Konzentration in aktuellen Kollektiven keinen signifikanten Risikofaktor für eine SBP dar, wie in dieser Arbeit gezeigt (Tabelle 7, S. 57) und bereits bei Bruns et al. (2015) beschrieben und diskutiert. Aus diesem Grund ist die Aszitesprotein-Konzentration als beeinflussende Drittvariable nicht überzeugend. In dieser Studie konnten zusätzlich zum *TRAF6*-Haplotyp 2 ein höherer MELD Score und verminderte Serumalbumin-Konzentrationen als unabhängige Risikofaktoren für eine SBP bestätigt werden, wie bereits in früheren Studien (Bruns et al. 2015, Schwabl et al. 2015). Auch nach der Korrektur für MELD Score und Albumin mit einer multivariaten Logistischen Regressionsanalyse war der *TRAF6*-Haplotyp 2 ein unabhängiger Indikator für ein signifikant erhöhtes SBP-Risiko.

In der Subanalyse von Patienten ohne HCC konnte die Assoziation des *TRAF6*-Haplotyps mit dem SBP-Risiko bestätigt werden. Die mit dem HCC verbundene erhöhte Mortalität und die damit einhergehende kürzere Beobachtungszeit haben daher keinen Einfluss auf das SBP-Risiko in der Gesamtkohorte.

Das *TRAF6*-Haplotyp assoziierte SBP-Risiko konnte auch in den Ätiologie-Subgruppen gezeigt werden, welches sich bei Patienten mit nicht-alkoholischer Leberzirrhose (OR: 3,07, 95%-KI: 1,19-7,92; $P=0,02$) als deutlich höher gegenüber Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose (OR: 1,72; 95%-KI: 0,99-2,99; $P=0,053$) erwies. Dabei waren die Häufigkeiten der *TRAF6*-Haplotypen in den beiden Ätiologie-Gruppen vergleichbar, auch unter den SBP-Fällen (Tabelle 9, S. 59). Der Unterschied im Chancenverhältnis begründete sich durch einen statistisch nicht signifikant höheren Anteil von Patienten mit SBP (35%) in der Gruppe der nicht-alkoholischen Leberzirrhose gegenüber Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose (26%). Die Ätiologie-Subgruppen zeigten jedoch hinsichtlich des Grades der Leberschädigung keine Unterschiede. Obwohl Alter selbst nicht als Risikofaktor für eine SBP gilt, könnte der Altersunterschied zwischen den Ätiologie-Subgruppen eine mögliche Erklärung für das höhere *TRAF6*-Haplotyp assoziierte SBP-Risiko bei Patienten mit nicht-alkoholischer Leberzirrhose sein. So waren Patienten mit nicht-alkoholischer Leberzirrhose von median 70 Jahren deutlich älter als Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose und einem medianen Alter von 57 Jahren ($P\leq 0,001$).

Denkbar ist in diesem Fall eine ungünstige Kombination aus einer altersbedingt verschlechterten Immunleistung (Shaw et al. 2013) und einer altersbedingt erhöhten Darmpermeabilität (Thevaranjan et al. 2017). Unabhängig von dieser Beobachtung bestätigt die Ätiologie-Subgruppen Analyse den *TRAF6*-Haplotyp als Ätiologie-unabhängigen Risikofaktor für die SBP.

In einer früheren Studie (Bruns et al. 2012a) zur Assoziation genetischer Varianten von *NOD2* mit dem Risiko einer SBP konnte gezeigt werden, dass diese abhängig vom mikrobiologischen Kulturergebnis ist. Die Analyse des *TRAF6*-Haplotyp assoziierten SBP-Risikos in den Gruppen für kulturpositive und kulturnegative SBPs bestätigte in beiden Subgruppen den *TRAF6*-Haplotyp als unabhängigen Risikofaktor.

In Zusammenschau der möglichen Einflussfaktoren für das SBP-Risiko bei Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose konnten die bereits bekannten Faktoren MELD Score und Serumalbumin-Konzentration bestätigt werden (Bruns et al. 2015, Schwabl et al. 2015). Erstmalig konnte in dieser Arbeit der *TRAF6*-Haplotyp als unabhängiger Risikofaktor für die SBP gezeigt werden. Dieser erfüllte seine Funktion unabhängig von der Diagnose eines Hepatozellulären Karzinoms, der Ätiologie der Leberzirrhose sowie des mikrobiologischen Kulturergebnisses. Somit stellt der *TRAF6*-Haplotyp einen belastbaren und geeigneten Parameter dar, um Patienten mit erhöhtem SBP-Risiko zu erkennen, entsprechend zu beobachten und für eine antibiotische Primärprophylaxe gezielt auszuwählen.

6.4 Die Bedeutung des *NOD2*-Genotyps für das *TRAF6*-Haplotyp assoziierte SBP-Risiko

Die *NOD2* Mutationen (Referenzsequenz: GRCh38.p7) NC_000016.10(*NOD2*):g.50712015C>T (rs2066844), NC_000016.10(*NOD2*):g.50722629G>C(rs2066845) und NC_000016.10(*NOD2*):g.50729867_50729868insC(rs2066847) wurden von Appenrodt et al. (2010) mit einem erhöhten SBP-Risiko assoziiert. In einer aktuellen Studie wird daher der *NOD2*-Genotyp als Grundlage für die antibiotische Primärprophylaxe der SBP untersucht (Casper et al. 2015). In jüngeren Studien

konnte jedoch die Assoziation des *NOD2*-Genotyps mit dem SBP-Risiko nur noch bedingt gezeigt werden. So konnten Bruns et al. (2012a) die Assoziation nur für SBPs mit mikrobiologisch positivem Kulturergebnis nachweisen. In einer aktuellen Studie von Lutz et al. (2015) mit 350 Patienten konnte keine Assoziation mit dem SBP-Risiko gezeigt werden. Ebenso kann in der hier präsentierten Studie keine Assoziation des *NOD2*-Genotyps mit dem SBP-Risiko, weder in der Gesamtkohorte noch im Hinblick auf das mikrobiologische Kulturergebnis, gesichert werden. Die Gründe für die Diskrepanzen der vier Studien zur Assoziation des *NOD2*-Genotyps mit dem SBP-Risiko blieben ungeklärt. Möglicherweise führten sowohl die Verschiedenheit der Kohorten (ausschließlich hospitalisierte Patienten im Vergleich zu einer Kombination aus ambulant betreuten und hospitalisierten Patienten wie bei Appenrodt et al. (2010)), die Größe der Studienpopulationen, Änderungen in der antibiotischen Primärprophylaxe der SBP oder Veränderungen in der Diagnostik mikrobiologischer Kulturergebnisse zu diesen Differenzen. Für die Studie dieser Arbeit konnten beeinflussende Drittvariablen, wie Unterschiede im Schweregrad der Lebererkrankung (MELD Score, Serumalbumin) oder des Immunstatus (CRP, WBC) zum Studieneinschluss für Patienten mit und ohne *NOD2* Mutation weitgehend ausgeschlossen werden.

Interessanterweise konnte das *TRAF6*-Haplotyp assoziierte SBP-Risiko nur für *NOD2* Wildtyp Patienten nachgewiesen werden ($P=0,005$), nicht aber für Träger einer der drei *NOD2* Varianten ($P=0,59$). Somit erweitert der *TRAF6*-Haplotyp die Population der Patienten unter Risiko, welche für Genotyp-basierte Primärinterventionen zur Prävention einer SBP in Frage kommen.

Über eine Interaktion der genetischen Varianten von *TRAF6* und *NOD2* gibt es bisher keine Erkenntnisse. Die biochemische Interaktion von *NOD2* und *TRAF6* innerhalb der PRR-Signalkaskade hingegen ist nachgewiesen. Die Aktivierung von *NOD2* führt zur Aktivierung von *TRAF6* entweder über eine RIP2-abhängige Aktivierung oder direkt durch Autoubiquitinierung von *TRAF6* (Abbott et al. 2007). Allein dadurch könnten die Mutationen von *NOD2* einen veränderten Aktivierungsstatus von *TRAF6* nach sich ziehen und so die Effekte des *TRAF6*-Haplotyps auf das *TRAF6*-Aktivierungslevel verringern. Allerdings existieren kontroverse Ansichten hinsichtlich der funktionalen Auswirkungen der *NOD2* Mutationen und somit eventuell unterschiedliche Effekte auf *TRAF6*. So stehen

NOD2 Mutationen bei Patienten mit Morbus Crohn gleichzeitig in Verbindung mit einem Verlust und einer verstärkten *NOD2* Proteinfunktion. (Eckmann und Karin 2005). In künftigen Forschungsprojekten sollte eine mögliche Interaktion der intronischen *TRAF6* SNPs mit den *NOD2* Mutationen untersucht werden, um den Zusammenhang mit dem assoziierten SBP-Risiko aufzuklären und neue Präventions- und Therapiestrategien zu entwickeln.

6.5 Die Bedeutung des *TRAF6*-Haplotyps für den Verlauf der ersten SBP-Episode und das Überleben

Klinisch präsentierten sich Patienten mit *TRAF6*-Haplotyp 2 während ihrer ersten SBP-Episode vergleichbar mit allen anderen *TRAF6*-Haplotypen (1, 3, M). Lediglich der CRP-Wert und die Leukozyten Konzentration deuteten auf einen inflammatorisch milderen Verlauf der SBP bei Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp 2 hin. Das spiegelte sich in einem besseren Überleben der ersten 28 Tage nach der SBP Diagnose wieder, erreichte im Modell mit $P=0,06$ bei dem zu Grunde gelegten Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ jedoch keine statistische Signifikanz. Schwabl et al. (2015) zeigten in einer Studienkohorte von 575 Patienten eine Abhängigkeit der SBP-bedingten Mortalität von der CRP-Serumkonzentration. Die CRP-Konzentrationen der SBP-Überlebenden der ersten 30 Tage waren mit 50,1 mg/L vergleichbar mit den Werten der *TRAF6*-Haplotyp 2 Gruppe von 50,0 mg/L. Ebenso waren die CRP-Werte der Patienten bei Schwabl et al. (2015), welche die ersten 30 Tage nach der SBP nicht überlebten, mit 73,1 mg/L vergleichbar mit den Werten der *TRAF6*-Haplotypen 1, 3, M von 84,0 mg/L. Dies untermauert den Trend zu einer weniger starken Entzündungsreaktion bei Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp 2 und stellt eine mögliche Erklärung dafür dar, dass trotz eines signifikant erhöhten SBP-Risikos bei Patienten des *TRAF6*-Haplotyp 2, die Gesamtmortalität unter adäquater Therapie unbeeinflusst war. Der enge Zusammenhang zwischen dem systemischen Entzündungsgrad und Organversagen mit darauffolgendem Tod, ist für Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose hinlänglich bekannt (Zimmermann et al. 2013, Moreau et al. 2013, Clària et al. 2016). So ist es denkbar, dass Patienten des *TRAF6*-Haplotyp 2 infolge einer reduzierten Immunaktivität anfälliger für Infektionen sind, diese gleichzeitig, genau wegen dieses reduzierten Immunreaktionspotentials,

milder verlaufen und somit zu weniger starken Organschäden und darüber hinaus seltener zum Tod führen. Der *TRAF6*-Haplotyp war in dieser Studie nicht mit der Mortalität assoziiert. Bekannte Risikofaktoren für den Tod von Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose, wie hohes Alter, Child-Pugh Klasse C, hoher MELD Score, HCC und SBP, konnten in dieser Studie bestätigt werden (D'Amico et al. 2006). Somit ist die Studienkohorte auch hinsichtlich der Mortalität und den entsprechenden Risikofaktoren repräsentativ für Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose.

6.6 Funktionelle Konsequenzen des *TRAF6*-Haplotyps für die systemische und peritoneale Immunität

Verschiedene Faktoren im Serum und Aszites sind als biologische Marker für bakterielle Translokation und damit verbundener geringfügiger kontinuierlicher Inflammation im Zusammenhang mit Leberzirrhose und anderen, vorwiegend entzündlichen Erkrankungen, beschrieben. In dieser Studie wurden Faktoren untersucht, welche in früheren Studien mit SBP und der Mortalität assoziiert waren. Die Analysen erfolgten für suPAR (Thunø et al. 2009, Zimmermann et al. 2013), LBP (Albillos 2003) und IL-6 (Navasa et al. 1998) im sterilen Aszites und Serum sowie für CXCL8 (Damas et al. 1997, Girón-González et al. 2001) und sCD163 (Grønbæk et al. 2016) im sterilen Aszites im Hinblick auf den *TRAF6*-Haplotyp. Zusätzlich dazu wurden die mRNA-Zytokinprofile von Peritonealmakrophagen und Monozyten aufgenommen.

Es zeigten sich statistisch signifikante Assoziationen für die Konzentration von suPAR im Aszites und die Expression von (mRNA)*IL6*, sowie (mRNA)*CXCL8* in Peritonealmakrophagen mit dem *TRAF6*-Haplotyp. Weitere Parameter der systemischen und peritonealen Immunität waren nicht mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert. Im Fokus auf die Mortalität, welche nachweislich auch nicht mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert war, erscheint dies konsistent zu den bisherigen Studien, welche die Serumkonzentrationen von suPAR (Thunø et al. 2009), LBP (Agiasotelli et al. 2017), IL-6 (Navasa et al. 1998) CXCL8 (Damas et al. 1997) und sCD163 (Grønbæk et al. 2016) sowie die Asziteskonzentration von IL-6 (Navasa et al. 1998) mit der Mortalität assoziierten. Darüber hinaus wurden höhere LBP- (Albillos 2003), IL-6- (Navasa et al. 1998), CXCL8- (Girón-González et al. 2001) und

suPAR- (Zimmermann et al. 2013) Werte in den früheren Studien für Patienten mit SBP im Vergleich zu Patienten ohne SBP gezeigt. Inwiefern diese Faktoren als unabhängige Risikofaktoren für eine SBP zu betrachten sind, wurde bisher nicht analysiert. Die Tatsache, dass diese Werte nicht mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert waren, lässt vermuten, dass es sich um keine zuverlässigen Prädiktoren für eine SBP handelt. Höhere Konzentrationen an suPAR, LBP, IL-6, CXCL8 und sCD163 bei SBP zeigen vielmehr eine akute Entzündungsreaktion an. Im Rahmen der Leberzirrhose-assoziierten Immundysregulation sind diese Parameter bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose gegenüber gesunden Probanden erhöht (Albillos et al. 2014) und weisen daher zusätzlich auf den Grad der Lebererkrankung hin.

Die signifikant geringere suPAR Konzentration im sterilen, nicht-neutrozytischen Aszites bei Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp 2 deutete auf einen geringeren zugrundeliegenden Aktivierungsstatus der peritonealen Immunzellen hin. Zimmermann et al. (2013) zeigten, dass höhere suPAR Werte im Aszites mit verstärkter peritonealer Infiltration korrelierten. Allerdings schien die bakterielle Translokation in dieser Studie nicht unmittelbar vom *TRAF6*-Haplotyp beeinflusst zu sein, denn LBP-Werte im sterilen Aszites waren vergleichbar. Hinzu kommt, dass LBP als Akutphase-Protein von Hepatozyten sezerniert wird und suPAR wiederum von aktivierten Leukozyten freigesetzt wird. Somit könnte die geringere Konzentration von suPAR bei Patienten vom *TRAF6*-Haplotyp 2 das Ergebnis eines generell weniger immunaktiven Haplotyps sein, welcher auch im Fall der akuten Infektion (SBP) zu einer weniger starken systemischen Immunreaktion führt, wie in dieser Studie beobachtet.

Weshalb sich der weniger immunaktive *TRAF6*-Haplotyp 2 nicht in den IL-6, CXCL8 und sCD163 Proteinkonzentrationen widerspiegelte, konnte mit dieser Studie nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise überdecken diverse Umweltfaktoren die Auswirkungen der genetischen Faktoren. Die können beispielsweise sein:

- Unterschiede im Zeitpunkt der Probenahme: IL-6 und CXCL8 (Castell et al. 1988, Basran et al. 2013) haben im Vergleich zu suPAR kurze Halbwertszeiten und sind möglicherweise bereits abgebaut. Dadurch könnten Expressionsunterschiede auf Proteinebene nicht mehr nachweisbar sein.

- Unterschiede bei der Patientenanzahl: Für lösliches CD163 wurden insgesamt nur 64 Patienten untersucht, für suPAR waren es 132 Patienten.
- Unterschiede der Krankheitsstadien: Möglicherweise gab es Unterschiede in den Subgruppen bezüglich des Schweregrades der Leberzirrhose oder anderer nicht erhobener Infektionen (Harnwegsinfektionen, Infektionen der Atemwege, uvm.), welche unterschiedlich behandelt worden sein könnten und damit verbundenen unterschiedlich stark ausgeprägter Inflamationsreaktionen.

Die Hinweise für einen weniger immunaktiven *TRAF6*-Haplotyp 2 bei steriler bakterieller Translokation fanden sich nur im Aszites und bei Peritonealmakrophagen. Biomarker der systemischen Zirkulation sowie Monozyten zeigten keine Assoziation mit dem *TRAF6*-Haplotyp. Unterschiede zwischen Peritonealmakrophagen und Monozyten können in den Zelltypen selbst begründet sein. So weisen Peritonealmakrophagen eine längere Lebenszeit und einen höheren Reifungsgrad auf und zeigen dadurch ein verändertes Immunverhalten im Vergleich zu Monozyten. Darüber hinaus könnte die Immunstimulation im Aszites, infolge einer höheren Konzentration bakterieller Produkte, ausgeprägter sein. Denn zum einen kumulieren bakterielle Produkte möglicherweise im Aszites und zum anderen wird das Blut in Teilen durch eine bestehende Restfunktion der Leber von bakteriellen Produkten gereinigt. Das Immunaktivierungspotential von Peritonealmakrophagen war *in vitro* nicht mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziiert und zeigte nur für CXCL8 eine geringere Sekretion bei Peritonealmakrophagen von Patienten mit dem *TRAF6*-Haplotyp 2, was auf einen moderaten immunmodifizierenden Effekt durch den *TRAF6*-Haplotyp deutet.

Die *in vitro* Analysen in Peritonealmakrophagen und Monozyten gaben keinen Hinweis auf eine Fehlregulation der *TRAF6* Expression selbst oder in Bezug auf *TRAF6*-regulierende Faktoren, wie A20 und TNIP1. Song et al. (2012) zeigten hingegen eine verminderte (mRNA)*TRAF6* Expression in PBMCs von gesunden Trägern des Minor-Allels des *TRAF6* SNPs rs4755453, welcher im *Linkage* zu rs331457 liegt. Mögliche Ursachen für diese kontroversen Beobachtungen können die unterschiedlichen Zellfraktionen sein, da Monozyten nur etwa 10-30% der PBMCs ausmachen oder die Tatsache, dass Song et al. PBMCs von gesunden Probanden analysierten, wohingegen unsere mRNA Daten in monozytären Zellen

von Patienten mit Leberzirrhose erhoben wurden, die krankheitsbedingt bereits hohe interindividuelle Unterschiede im Expressionsniveau aufweisen können.

Ebenso zeigte sich keine mechanistische Evidenz der *TRAF6*-Haplotypen für eine Dysregulation der NF- κ B Aktivierung in monozytären Zellen. Eine grundlegende Modifizierung der *TRAF6*-vermittelten Signalkaskade erscheint daher unwahrscheinlich. Es bleibt ungeklärt, ob die Effekte des *TRAF6*-Haplotyps auf die peritoneale Immunität unmittelbare Konsequenzen von Veränderungen in der Signalkaskade von Makrophagen sind oder diese indirekt über Immunzellen anderer Kompartimente, wie beispielsweise dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe oder Kupffer-Zellen der Leber, vermittelt werden.

Die Untersuchung der *TRAF6* SNPs auf genetischer Ebene hinsichtlich Regulation, Konservierung und Interaktion zeigte, dass es sich bei beiden SNPs um phylogenetisch junge Insertionen handelt. Dabei liegt rs331457 innerhalb eines kurzen repetitiv eingestreuten Kernsequenzelementes (SINE), welches bei Säugern konserviert ist. Weder rs331457 noch rs5030419 befinden sich innerhalb regulierender Strukturen, wie *Enhancer*, *Silencer*, Isolatorelementen, Promotoren oder Lokus-Kontrollregionen (Kent et al. 2002). Genetische Interaktionen mit anderen DNA Bereichen zeigten sich nur in unmittelbar benachbarten Genen (Wang et al. 2017). Insbesondere rs331457 liegt im starken *Linkage Disequilibrium* mit verschiedenen SNPs in der 3'untranslatierten Region des *Proline rich 5 like* Genes (*PRR5L*) und im *Recombination activating gene 1* (*RAG1*). Es ist denkbar, dass sich der klinische Phänotyp des *TRAF6*-Haplotyps, mechanistisch durch Veränderungen in der *PRR5L* und/oder *RAG1* Expression begründet. Denn *RAG1* ist von großer Bedeutung für die Reifung von B- und T-Zellen und könnte deshalb Einfluss auf die adaptive Immunreaktion während einer SBP nehmen (Schatz et al. 1989, Oettinger et al. 1990). *PRR5L* nimmt abhängig von der Interaktion mit *mechanistic target of rapamycin complex 2* (mTORC2) Einfluss auf das Zellüberleben, die Zellmigration oder Apoptose (Sarbasov et al. 2005, Thedieck et al. 2007, Gan et al. 2012). Zudem verstärkt *PRR5L* die Tristetraprolin-bedingte Degradation der mRNA von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren (Chen und Shyu 1995). Allerdings konnte in dieser Arbeit keine Assoziation des *TRAF6*-Haplotyps mit der *PRR5L*-Expression bei stimulierten Peritonealmakrophagen gezeigt werden. Zur genaueren Entschlüsselung der mechanistischen Hintergründe des *TRAF6*-Haplotyps,

erscheint es daher sinnvoll die *RAG1* Expression zu analysieren, insbesondere in Zellen des adaptiven Immunsystems.

6.7 Limitationen der Arbeit

6.7.1 Limitationen der klinischen Kohortenstudie

Diese Arbeit präsentiert erstmals eine Genotyp-Phänotyp Assoziation des *TRAF6*-Haplotyps mit dem SBP-Risiko bei hydropisch dekompensierter Leberzirrhose. Diese Assoziation wurde nach einem Kandidatengen-Ansatz (Tabor et al. 2002) untersucht. Allerdings fehlt bisher die Bestätigung der wahren Genotyp-Phänotyp-Assoziation durch eine unabhängige Replikationsstudie, welche dafür zwingend erforderlich ist (Chanock et al. 2007). In einer ersten Replikationsstudie sollte die Struktur der analysierten Kohorte vergleichbar, besser noch identisch zu der Kohorte der initialen Studie sein und darüber hinaus in weiteren Replikationsstudien auf andere ethnische Populationen ausgeweitet werden. Somit stellt die hier präsentierte Studie den ersten Schritt zur Etablierung des *TRAF6*-Haplotyps als SBP-Risikofaktor und zur Erforschung des kausalen Zusammenhangs dar.

Durch die großzügig formulierten Einschlusskriterien der Studie bestanden zwei große Gefahren:

- (1) Einschluss von Patienten mit sehr unterschiedlich fortgeschrittener Leberzirrhose
- (2) Inadäquate Berücksichtigung aller Zeiten unter SBP-Risiko.

Um diese Gefahren rückwirkend berücksichtigen zu können, wurden umfangreiche Daten zum Studieneinschluss und retrospektiv für eine zurückliegende erste SBP-Episode erhoben und analysiert. Insbesondere bezüglich des Alters, Geschlechtes, der Ätiologie der Leberzirrhose und des Schweregrades der Lebererkrankung zum Einschlusszeitpunkt konnte Strukturgleichheit gezeigt werden. Es wäre jedoch idealer Patienten bei Erstdekompensation einzuschließen und anschließend rein prospektiv zu beobachten. Die Limitationen der retrospektiven Datenerhebung wurden bereits in 6.2, Seite 78 beschrieben.

In der Studie fehlt die Analyse von Komorbiditäten, die über das Auftreten von Karzinomen hinausgeht. Insbesondere Erkrankungen, welche in Verbindung mit einem erhöhten Infektionsrisiko diskutiert werden, wie Autoimmunerkrankungen,

wären geeignete Kandidaten. Beispielsweise zeigten Diabetiker in einer großen kanadischen Studie häufiger bakterielle Infektionen, darunter auch für die Peritonitis (Shah und Hux 2003). In diesem Kontext und in Anbetracht der hohen Prävalenz sollte Diabetes als Komorbidität bei Leberzirrhose (Hickman und Macdonald 2007) in zukünftigen Studien analysiert werden.

Bekannte Risikofaktoren für eine SBP oder eine erhöhte Sterblichkeit bei Leberzirrhose wurden in dieser Studie mittels linearer Regression beziehungsweise einem Cox-Regressionsmodell analysiert. Die dadurch als relevant detektierten Parameter wurden anschließend in einem entsprechenden multivariaten Regressionsmodell untersucht. Dies ermöglichte es die Bedeutung einzelner Einflussfaktoren in Ihrem Zusammenwirken für das SBP-Risiko, beziehungsweise die Mortalität abzuschätzen. Über die analysierten Parameter hinaus wären jedoch weitere Faktoren, die sowohl das Risiko einer SBP und oder das Überleben beeinflusst haben könnten, interessant gewesen (z.B. die Behandlung mit Protonenpumpen-Inhibitoren, Angaben zum Lebensstil (insbesondere Alkohol- und Tabakkonsum) sowie Änderungen des Lebensstiles während der Beobachtungszeit und die ethnische Abstammung). Diese sollten in zukünftigen Studien ebenfalls berücksichtigt werden.

Weiterhin ist zu beachten, dass Patienten aus einer vorausgegangenen Studie von Bruns et al. (2016a) zur Analyse der prognostischen Bedeutung bakterieller DNA bei Patienten mit Leberzirrhose und dem Verdacht auf eine Infektion eingeschlossen wurden. Dies birgt das Risiko eines Selektionsbias.

Der Zeitraum der drei Rekrutierungsperioden von 2007-2015 war sehr lang. Es lässt sich nicht sicher ausschließen, dass sich innerhalb dieser Zeit die Behandlung, einschließlich der Medikation, der hydropisch dekompenzierten Leberzirrhose sowie die Prophylaxe- und Therapiemaßnahmen bei einer SBP geändert haben.

6.7.2 Limitationen der funktionellen Analysen

Bei der Auswahl der Patientenproben für die funktionellen Analysen wurde penibel auf das Nicht-Vorliegen einer SBP geachtet. Zusätzlich wäre es günstig gewesen repräsentative Patienten entsprechend der Gesamtkohorte auszuwählen, insbesondere im Hinblick auf den Schweregrad der Leberzirrhose. Für die mRNA-Expressionsdaten von *CXCL8* erfolgte post-hoc die Analyse des Child-Pugh

Stadiums, da Zimmermann et al. (2011) eine Korrelation der CXCL8 Serumkonzentration mit dem Child-Pugh Stadium zeigten. Hierbei ergab sich, dass sich 11% (1/9) der Patienten mit dem *TRAF6*-Haplotyp 2 und 32% (8/25) der Patienten mit den anderen *TRAF6*-Haplotypen (1, 3, M) im Child-Pugh Stadium C befanden. Zum einen unterschied sich der Anteil von Child-Pugh B und C Patienten zwischen den *TRAF6*-Haplotyp Gruppen und zum anderen war die Probenauswahl nicht repräsentativ für die Gesamtkohorte, bei der 66% der Patienten mit Child-Pugh C klassifiziert sind. Im Mann-Whitney U-Test unterschieden sich die *TRAF6*-Haplotyp Gruppen der Patienten, deren Zellen für die funktionellen Analysen verwendet wurden, weder hinsichtlich des MELD Scores, noch für die messbaren Parameter INR, Albumin- und Bilirubinkonzentration, die zur Festlegung des Child-Pugh Stadiums herangezogen werden. Daher korrigierten wir die in den funktionellen Analysen erhobenen Daten nicht für das Child-Pugh Stadium. Diese post-hoc Analyse gilt in weiten Teilen für alle mRNA Analysen, da hierfür in weiten Teilen die gleichen Patientenproben untersucht wurden. Abschließend kann der Einfluss durch den Schweregrad der Leberzirrhose nicht eindeutig bestimmt werden.

Die funktionellen Analysen wurden alle mit Patientenmaterial, d.h. mit primären Monozyten und Peritonealmakrophagen oder im Serum und Aszites durchgeführt. Hierbei gilt zu beachten, dass es große interindividuelle Unterschiede, insbesondere durch die nicht kontrollier- und steuerbaren Umweltfaktoren gegeben haben kann. Bei einer ausreichend hohen Stichprobenanzahl für den jeweilig erwarteten Effekt sollten sich diese sogenannten Zufallsfehler ausgleichen (Gaus und Muche 2017). Da die erwarteten Effekte jedoch höchstens abgeschätzt werden können, wäre selbst das Ergebnis einer Berechnung der notwendigen Stichprobenanzahl extrem unsicher, weswegen in dieser Arbeit darauf verzichtet wurde. Im Ergebnisteil wurden stattdessen die Stichprobengrößen immer angegeben und bewegten sich bei den mRNA Analysen zwischen 7-10 für *TRAF6*-Haplotyp 2 und in Summe 10-27 für die anderen *TRAF6*-Haplotypen (1, 3, M). Limitiert durch das begrenzt verfügbare Patientenmaterial waren die Stichprobengrößen für die Proteinanalysen teilweise geringer als für die mRNA Analysen, mit im Mittel 4 für *TRAF6*-Haplotyp 2 und 13 für alle anderen *TRAF6*-Haplotypen (1, 3, M). Die Analysen im Serum bzw. Aszites erfolgten mit deutlich größerem Stichprobenumfang mit mindestens 33 Patienten des *TRAF6*-Haplotyp 2

und 99 Patienten der anderen *TRAF6*-Haplotypen (1, 3, M), mit Ausnahme von sCD163. Die Ergebnisse stellen somit keinen Anspruch auf Kausalität sondern geben erste Hinweise für einen kausalen Zusammenhang zwischen dem *TRAF6*-Haplotyp und dem Phänotyp und ermöglichen eine genauere Abschätzung der Varianz bei den untersuchten Parametern. Das sind wichtige Informationen für die Planung weiterer Studien. Zur Überprüfung der Kausalität wären kurzfristig Zellkultur- und Tiermodelle geeignet, bei denen die äußeren Einflussfaktoren besser kontrollier- und steuerbar sind. Mit *Knockout* bzw. *Knockdown* Modellen, bei denen die Expression entweder von TRAF6 selbst oder der mit dem *TRAF6*-Haplotyp assoziierten Parameter suPAR, CXCL8 und IL-6, verringert werden, kann der *TRAF6*-Haplotyp 2 imitiert und genauer untersucht werden. Alternativ oder ergänzend könnten mit gentechnischen Methoden, wie CRISPER/Cas, die *TRAF6*-Haplotypen generiert und untersucht werden. Die Ergebnisse aus solchen Untersuchungen müssten anschließend in einer prospektiven Langzeitstudie bestätigt werden um Kausalität zu belegen.

7 Schlussfolgerungen

Patienten mit hydropisch dekompensierter Leberzirrhose sind sehr anfällig für bakterielle Infektionen. Diese sind eng verknüpft mit einer starken systemischen Inflammation, welche zum Organversagen und infolgedessen zum Tod beitragen. Obwohl die zugrundeliegenden Pathomechanismen, welche zum Organversagen führen immer besser verstanden werden, konnten weder die Häufigkeiten bakterieller Infektionen verringert, noch der Ausgang einer Infektion verbessert werden. Die Mortalitätsraten nach bakterieller Infektion bei Leberzirrhose sind unverändert hoch. Die antibiotische Prophylaxe zeigte sich zwar als wirksam in der Prävention der SBP, ist aber aufgrund zunehmender Antibiotikaresistenzen nur für Hochrisikopatienten empfohlen. Daraus eröffnen sich mehrere wichtige Ansatzpunkte: (1) Es müssen Faktoren zur Identifizierung von Hochrisikopatienten definiert werden; (2) Es müssen nicht-antibiotische Präventionsmaßnahmen etabliert werden, die Infektionen verhindern und (3) Es müssen neue, effektivere Therapien entwickelt werden, die das Überleben einer solchen Infektion verbessern.

In dieser Arbeit konnte der *TRAF6*-Haplotyp als geeigneter Faktor zur Identifizierung von Hochrisikopatienten für eine SBP bestätigt werden. Erstmals wurden bei einer Assoziationsstudie genetischer Polymorphismen mit dem SBP-Risiko, klinische Parameter stattgehabter SBP-Episoden mit dem Genotyp assoziiert und Analysen zum Verständnis der zugrundeliegenden funktionellen Mechanismen der SNPs präsentiert. Es ergaben sich erste Hinweise, dass ein milderer Verlauf der systemischen Inflammation für das Überleben einer SBP vorteilhaft ist und dass der Risiko *TRAF6*-Haplotyp 2 mit einem mildereren Verlauf assoziiert ist. Auch erwies sich die Basalexpression der Zytokine IL-6, IL-1 β und CXCL8 und die CXCL8-Sekretion nach TLR-4-Stimulation, als Surrogatparameter der Inflammation, bei Peritonealmakrophagen als vermindert. Dabei schienen die SNPs keine direkten Assoziationen mit der basalen *TRAF6*-Expression und der *TRAF6*-vermittelten NF- κ B-Aktivierung zu haben. Obwohl diese Ergebnisse den Pathomechanismus nicht erklären, weisen sie auf geringe funktionelle Auswirkungen der SNPs für die peritoneale Immunität hin, welche im Rahmen einer Infektion nicht ausreichend kompensiert werden können. Denkbar ist auch der Einfluss über benachbarte Gene, über Zellen anderer Kompartimente, z.B. den Paneth-Zellen des Darms oder den

Kupffer-Zellen der Leber oder innerhalb alternativer TRAF6-vermittelter Signalwege, z.B. der TRAF6-CD40-Interaktion. Um die genauen Mechanismen aufzuklären, sollte in zukünftigen Projekten eine PRR-abhängige und PAMP-Konzentrationsabhängige Stimulation monozytärer Zellen genauer analysiert werden. Eine Untersuchung des Darm-assoziierten Immunsystems (GALT) und der Leberimmunzellen könnte zur Aufklärung der mechanistischen Wirkweise der *TRAF6* SNPs beitragen. Diese Zellen sind beim Menschen jedoch nur schwer zugänglich. Humane Zelllinien, als Modell für GALT und Kupffer-Zellen sind bisher nicht etabliert. Als Tiermodell existiert lediglich ein Rattenmodell, bei dem mittels Tetrachlormethan Leberzirrhose mit Aszites und pathologischer bakterieller Translokation induziert werden kann (Proctor and Chatamra 1983, Garcia-Tsao et al. 1995). Allerdings müsste zuvor das Rattengenom für die Untersuchung der *TRAF6* SNPs gentechnisch modifiziert werden. Mit der CRISPR/Cas-Methode könnten die *TRAF6*-Haplotypen im Tiermodell oder auch in Zelllinien für anschließende Untersuchungen generiert werden. Die genetische Interaktion der *TRAF6* SNPs mit dem benachbarten *RAG1*-Gen in Immunzellen der adaptiven Immunabwehr ist ein weiterer möglicher Schauplatz. *TRAF6* SNPs könnten den Reifegrad von T- und B-Zellen und deren Beitrag zur systemischen Inflammation unterschiedlich beeinflussen. Das sollte in weiterführenden Forschungsprojekten untersucht werden.

Als Ergänzung und in Zusammenschau mit den bisher bekannten genetischen Risikofaktoren, dem MELD Score und der Serumalbumin-Konzentration ist der *TRAF6*-Haplotyp für die Risikoabwägung einer SBP sehr gut geeignet. Patienten, die als Hochrisikopatienten identifiziert werden, könnten unmittelbar von einer intensiveren ärztlichen Beobachtung und einer angepassten Primärprophylaxe profitieren. Der *TRAF6*-Haplotyp könnte zudem als Einschlusskriterium für klinische Studien mit neuen Prophylaxe- bzw. Therapieansätzen für die SBP herangezogen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Patienten mit einer SBP von einer anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Therapie profitieren könnten. Beispielsweise könnten Präparate, welche die Interaktion von TRAF6 mit CD40 inhibieren und die sich im Tiermodell bei Peritonitis und Sepsis als vorteilhaft erwiesen haben (Zarzycka et al. 2015), zur Prävention von Inflammation und Infektion bei fortgeschrittener Leberzirrhose beitragen.

Literaturverzeichnis

- Abbott DW, Yang Y, Hutti JE, Madhavarapu S, Kelliher MA, Cantley LC. 2007. Coordinated Regulation of Toll-Like Receptor and NOD2 Signaling by K63-Linked Polyubiquitin Chains. *Molecular and Cellular Biology* 27(17):6012–6025.
- Agiasotelli D, Alexopoulou A, Vasilieva L, Hadziyannis E, Goukos D, Daikos GL, Dourakis SP. 2017. High serum lipopolysaccharide binding protein is associated with increased mortality in patients with decompensated cirrhosis. *Liver International* 37(4):576–582.
- Albillos A. 2003. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 37(1):208–217.
- Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. 2014. Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. *Journal of Hepatology* 61(6):1385–1396.
- Amos CI, Chen WV, Lee A, Li W, Kern M, Lundsten R, Batliwalla F, Wener M, Remmers E, Kastner DA, et al. 2006. High-density SNP analysis of 642 Caucasian families with rheumatoid arthritis identifies two new linkage regions on 11p12 and 2q33. *Genes and Immunity* 7(4):277–286.
- Appenrodt B, Grünhage F, Gentemann MG, Thyssen L, Sauerbruch T, Lammert F. 2010. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology* 51(4):1327–1333.
- Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, Burroughs AK. 2010. Infections in Patients With Cirrhosis Increase Mortality Four-Fold and Should Be Used in Determining Prognosis. *Gastroenterology* 139(4):1246-1256.e5.
- Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis GI, Karatza E, Triantos C, Vagianos CE, Spiliopoulou I, Kaltezioti V, Charonis A, Nikolopoulou VN, et al. 2012. Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. *European Journal of Clinical Investigation* 42(4):439–446.
- Attinkara R, Mwinyi J, Truninger K, Regula J, Gaj P, Rogler G, Kullak-Ublick GA, Eloranta JJ, The Swiss IBD Cohort Study Group. 2012. Association of genetic variation in the NR1H4 gene, encoding the nuclear bile acid receptor FXR, with inflammatory bowel disease. *BMC Research Notes* 5(1):461.

- Bajaj JS, Ananthakrishnan AN, Hafeezullah M, Zadvornova Y, Dye A, McGinley EL, Saeian K, Heuman D, Sanyal AJ, Hoffmann RG. 2010. Clostridium difficile Is Associated With Poor Outcomes in Patients With Cirrhosis: A National and Tertiary Center Perspective. *The American Journal of Gastroenterology* 105(1):106–113.
- Barrett JC. 2011. Chapter 2 - Population Genetics and Linkage Disequilibrium A2 - Zeggini, Eleftheria. In *Analysis of Complex Disease Association Studies*, Morris A (ed). Academic Press; 15–23.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21(2):263–265.
- Basran A, Jabeen M, Bingle L, Stokes CA, Dockrell DH, Whyte MKB, Walmsley SR, Higgins KR, Vogel SN, Wilson HL, et al. 2013. Roles of neutrophils in the regulation of the extent of human inflammation through delivery of IL-1 and clearance of chemokines. *Journal of Leukocyte Biology* 93(1):7–19.
- Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JP, Wittwer CT. 1998. Homogeneous Multiplex Genotyping of Hemochromatosis Mutations with Fluorescent Hybridization Probes. *The American Journal of Pathology* 153(4):1055–1061.
- Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F. 2013. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology* 58(3):593–608.
- Bonnel AR, Bunchorntavakul C, Reddy KR. 2011. Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 9(9):727–738.
- Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad R-C, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, et al. 2004. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature Immunology* 5(10):1052–1060.
- Borzio M, Salerno F, Piantoni L, Cazzaniga M, Angeli P, Bissoli F, Boccia S, Colloredo-Mels G, Corigliano P, Fornaciari G, et al. 2001. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 33(1):41–48.
- Brookes AJ. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234(2):177–186.
- Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. 2003. Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. *The Journal of Immunology* 171(11):6164–6172.

- Bruns T. 2018. Untersuchungen zur immunologischen Vermittlung von Inflammation, Infektion und Organversagen im Verlauf chronischer Lebererkrankungen. Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena.
- Bruns T, Peter J, Reuken PA, Grabe DH, Schuldes SR, Brenmoehl J, Schölmerich J, Wiest R, Stallmach A. 2012a. NOD2 gene variants are a risk factor for culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and monomicrobial bacterascites in cirrhosis: NOD2 variants and SBP. *Liver International* 32(2):223–230.
- Bruns T, Reuken PA, Fischer J, Berg T, Stallmach A. 2012b. Further evidence for the relevance of TLR2 gene variants in spontaneous bacterial peritonitis. *Journal of Hepatology* 56(5):1207–1208.
- Bruns T, Zimmermann HW, Stallmach A. 2014. Risk factors and outcome of bacterial infections in cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology* 20(10):2542.
- Bruns T, Lutz P, Stallmach A, Nischalke HD. 2015. Low ascitic fluid protein does not indicate an increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in current cohorts. *Journal of Hepatology* 63(2):527–528.
- Bruns T, Reuken PA, Stengel S, Gerber L, Appenrodt B, Schade JH, Lammert F, Zeuzem S, Stallmach A. 2016a. The prognostic significance of bacterial DNA in patients with decompensated cirrhosis and suspected infection. *Liver International* 36(8):1133–1142.
- Bruns T, Roeb E, Goeser F. 2016b. Mikrobiom und Lebererkrankungen. In *Mikrobiom: Wissensstand und Perspektiven*, Stallmach A, , Vehreschild M (eds). Walter de Gruyter, GmbH; 93–115.
- Caly WR, Strauss E. 1993. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology* 18(3):353–358.
- Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. 2004. Selecting a Maximally Informative Set of Single-Nucleotide Polymorphisms for Association Analyses Using Linkage Disequilibrium. *The American Journal of Human Genetics* 74(1):106–120.
- Casper M, Mengel M, Fuhrmann C, Herrmann E, Appenrodt B, Schiedermaier P, Reichert M, Bruns T, Engelmann C, Grünhage F, et al. 2015. The INCA trial (Impact of NOD2 genotype-guided antibiotic prevention on survival in patients with liver Cirrhosis and Ascites): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 16(1).
- Castell JV, Geiger T, Gross V, Andus T, Walter E, T. Hirano, Kishimoto T, Heinrich PC. 1988. Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. *European Journal of Biochemistry* 177(2):357–361.

- Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. 2015. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience* 4(1).
- Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter DJ, Thomas G, Hirschhorn JN, Abecasis G, Altshuler D, Bailey-Wilson JE, et al. 2007. Replicating genotype–phenotype associations. *Nature* 447(7145):655–660.
- Chen C-YA, Shyu A-B. 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences* 20(11):465–470.
- Christensen K, Murray JC. 2007. What Genome-wide Association Studies Can Do for Medicine. *New England Journal of Medicine* 356(11):1094–1097.
- Cirera I, Martin Bauer T, Navasa M, Vila J, Grande L, Taurá P, Fuster J, García-Valdecasas JC, Lacy A, Suárez MJ, et al. 2001. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology* 34(1):32–37.
- Clària J, Stauber RE, Coenraad MJ, Moreau R, Jalan R, Pavesi M, Amorós À, Titos E, Alcaraz-Quiles J, Oettl K, et al. 2016. Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure: Clària, Stauber et al. *Hepatology* 64(4):1249–1264.
- Clark E, Hoare C, Tanianis-Hughes J, Carlson GL, Warhurst G. 2005. Interferon γ Induces Translocation of Commensal *Escherichia coli* Across Gut Epithelial Cells via a Lipid Raft–Mediated Process. *Gastroenterology* 128(5):1258–1267.
- Dahiya Y, Pandey RK, Sodhi A. 2011. Nod2 Downregulates TLR2/1 Mediated IL1 β Gene Expression in Mouse Peritoneal Macrophages (S Bereswill, Ed). *PLoS ONE* 6(11):e27828.
- Damas P, Canivet JL, de Groote D, Vrindts Y, Albert A, Franchimont P, Lamy M. 1997. Sepsis and serum cytokine concentrations. *Critical Care Medicine* 25(3):405–412.
- D’Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. 2006. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *Journal of Hepatology* 44(1):217–231.
- Dinya T, Tornai T, Vitalis Z, Tornai I, Balogh B, Tornai D, Antal-Szalmas P, Sumegi A, Andrikovics H, Bors A, et al. 2018. Functional polymorphisms of innate immunity receptors are not risk factors for the non-SBP type bacterial infections in cirrhosis. *Liver International*.
- EASL (Ed.). 2010. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Journal of Hepatology* 53(3):397–417.

- ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. Annual epidemiological report: reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data 2013., Stockholm: ECDC.
- Eckmann L, Karin M. 2005. NOD2 and Crohn's Disease: Loss or Gain of Function? *Immunity* 22(6):661–667.
- Ellinghaus D, Zhang H, Zeissig S, Lipinski S, Till A, Jiang T, Stade B, Bromberg Y, Ellinghaus E, Keller A, et al. 2013. Association Between Variants of PRDM1 and NDP52 and Crohn's Disease, Based on Exome Sequencing and Functional Studies. *Gastroenterology* 145(2):339–347.
- Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. 2007. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39(2):175–191.
- Fernández J, Navasa M, Planas R, Montoliu S, Monfort D, Soriano G, Vila C, Pardo A, Quintero E, Vargas V, et al. 2007. Primary Prophylaxis of Spontaneous Bacterial Peritonitis Delays Hepatorenal Syndrome and Improves Survival in Cirrhosis. *Gastroenterology* 133(3):818–824.
- Fernández J, Acevedo J, Castro M, Garcia O, Rodríguez de Lope C, Roca D, Pavesi M, Sola E, Moreira L, Silva A, et al. 2012. Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: A prospective study. *Hepatology* 55(5):1551–1561.
- Fernández J, Acevedo J, Prado V, Mercado M, Castro M, Pavesi M, Arteaga M, Sastre L, Juanola A, Ginès P, et al. 2017. Clinical course and short-term mortality of cirrhotic patients with infections other than spontaneous bacterial peritonitis. *Liver International* 37(3):385–395.
- Förster T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437(1–2):55–75.
- Fritz T, Niederreiter L, Tilg H, Blumberg RS, Kaser A. 2010. Controversy over NOD2, inflammation, and defensins. *Inflammatory Bowel Diseases* 16(11):1996–1998.
- Gäbele E, Mühlbauer M, Paulo H, Johann M, Meltzer C, Leidl F, Wodarz N, Wiest R, Schölmerich J, Hellerbrand C. 2009. Analysis of monocyte chemotactic protein-1 gene polymorphism in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *World Journal of Gastroenterology* 15(44):5558–5562.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, et al. 2002. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science (New York, N.Y.)* 296(5576):2225–2229.

- Gan X, Wang J, Wang C, Sommer E, Kozasa T, Srinivasula S, Alessi D, Offermanns S, Simon MI, Wu D. 2012. PRR5L degradation promotes mTORC2-mediated PKC- δ phosphorylation and cell migration downstream of G α 12. *Nature Cell Biology* 14(7):686–696.
- Garcia-Tsao G, Lee F-Y, Barden GE, Cartun R, Brian West A. 1995. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 108(6):1835–1841.
- Gaus W, Muche R. 2017. *Medizinische Statistik: angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe*, Stuttgart: Schattauer.
- Gerbes A, Gülberg V, Sauerbruch T, Wiest R, Appenrodt B, Bahr M, Dollinger M, Rössle M, Schepke M. 2011. S3-Leitlinie „Aszites, spontan bakterielle Peritonitis, hepatorenales Syndrom“. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 49(06):749–779.
- Ginés P, Rimola A, Planas R, Vargas V, Marco F, Almela M, Forne M, Miranda ML, Llach J, Salmerón JM, et al. 1990. Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: Results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatology* 12(4):716–724.
- Ginès P, Angeli P, Lenz K, Møller S, Moore K, Moreau R, Merkel C, Ring-Larsen H, Bernardi M. 2010. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Journal of Hepatology* 53(3):397–417.
- Girón-González JA, Rodríguez-Ramos C, Elvira J, Galán F, Del Alamo CF, Díaz F, Martín-Herrera L. 2001. Serial analysis of serum and ascitic fluid levels of soluble adhesion molecules and chemokines in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clinical and Experimental Immunology* 123(1):56–61.
- Goel GA, Deshpande A, Lopez R, Hall GS, van Duin D, Carey WD. 2012. Increased Rate of Spontaneous Bacterial Peritonitis Among Cirrhotic Patients Receiving Pharmacologic Acid Suppression. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 10(4):422–427.
- Grant SFA, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadóttir A, et al. 2006. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 38(3):320–323.
- Grønbæk H, Rødgaard-Hansen S, Aagaard NK, Arroyo V, Moestrup SK, Garcia E, Solà E, Domenicali M, Piano S, Vilstrup H, et al. 2016. Macrophage activation markers predict mortality in patients with liver cirrhosis without or with acute-on-chronic liver failure (ACLF). *Journal of Hepatology* 64(4):813–822.

- Groves CJ, Zeggini E, Minton J, Frayling TM, Weedon MN, Rayner NW, Hitman GA, Walker M, Wiltshire S, Hattersley AT, et al. 2006. Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. *Diabetes* 55(9):2640–2644.
- Gunnarsdottir SA, Sadik R, Shev S, Simren M, Sjovall H, Stotzer P-O, Abrahamsson H, Olsson R, Bjornsson ES. 2003. Small intestinal motility disturbances and bacterial overgrowth in patients with liver cirrhosis and portal hypertension. *The American Journal of Gastroenterology* 98(6):1362–1370.
- Guo C, Zhang L, Nie L, Zhang N, Xiao D, Ye X, Ou M, Liu Y, Zhang B, Wang M, et al. 2016. Association of polymorphisms in the MyD88, IRAK4 and TRAF6 genes and susceptibility to type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy in a southern Han Chinese population. *Molecular and Cellular Endocrinology* 429:114–119.
- Haft DH, DiCuccio M, Badretdin A, Brover V, Chetvernin V, O'Neill K, Li W, Chitsaz F, Derbyshire MK, Gonzales NR, et al. 2018. RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. *Nucleic Acids Research* 46(D1):D851–D860.
- Hamonic G, Pasternak JA, Wilson HL. 2018. Recognizing conserved non-canonical localization patterns of toll-like receptors in tissues and across species. *Cell and Tissue Research* 372(1):1–11.
- He J, Chen Y, Lin Y, Zhang W, Cai Y, Chen F, Liao Q, Yin Z, Wang Y, Tao S, et al. 2017. Association study of MCP-1 promoter polymorphisms with the susceptibility and progression of sepsis (P Proost, Ed). *PLOS ONE* 12(5):e0176781.
- Hickman IJ, Macdonald GA. 2007. Impact of Diabetes on the Severity of Liver Disease. *The American Journal of Medicine* 120(10):829–834.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, et al. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837):599–603.
- Inomata M, Niida S, Shibata K, Into T. 2012. Regulation of Toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective autophagy is normally inactivated by A20. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(6):963–979.
- Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 11(5):373–384.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler a. D. 2002. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research* 12(6):996–1006.

- Kobayashi KS. 2005. Nod2-Dependent Regulation of Innate and Adaptive Immunity in the Intestinal Tract. *Science* 307(5710):731–734.
- Kruglyak L, Nickerson DA. 2001. Variation is the spice of life. *Nature Genetics* 27(3):234–236.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25(4):402–408.
- Loomba R, Wesley R, Bain A, Csako G, Pucino F. 2009. Role of Fluoroquinolones in the Primary Prophylaxis of Spontaneous Bacterial Peritonitis: Meta-Analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 7(4):487–493.
- Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Wijnands E, Soehnlein O, Zernecke A, Seijkens T, Engel D, Cleutjens J, Keller AM, et al. 2010. Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile. *The Journal of Experimental Medicine* 207(2):391–404.
- Lutz P, Berger C, Langhans B, Grünhage F, Appenrodt B, Nattermann J, Lammert F, Hoerauf A, Sauerbruch T, Strassburg CP, et al. 2014. A farnesoid X receptor polymorphism predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *Digestive and Liver Disease* 46(11):1047–1050.
- Lutz P, Krämer B, Kaczmarek DJ, Hübner MP, Langhans B, Appenrodt B, Lammert F, Nattermann J, Hoerauf A, Strassburg CP, et al. 2015. A variant in the nuclear dot protein 52kDa gene increases the risk for spontaneous bacterial peritonitis in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*.
- Mauro C, Pacifico F, Lavorgna A, Mellone S, Iannetti A, Acquaviva R, Formisano S, Vito P, Leonardi A. 2006. ABIN-1 Binds to NEMO/IKK γ and Co-operates with A20 in Inhibiting NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry* 281(27):18482–18488.
- McVean GA, Altshuler (Co-Chair) DM, Durbin (Co-Chair) RM, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, Clark AG, Donnelly P, Eichler EE, Hurles ME, et al. 2012. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491(7422):56–65.
- Mokdad AA, Lopez AD, Shahrzaz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, Murray CJ, Naghavi M. 2014. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Medicine* 12(1).
- Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M, et al. 2013. Acute-on-Chronic Liver Failure Is a Distinct Syndrome That Develops in Patients With Acute Decompensation of Cirrhosis. *Gastroenterology* 144(7):1426-1437.e9.

- Namjou B, Choi C-B, Harley ITW, Alarcón-Riquelme ME, BIOLUPUS Network, Kelly JA, Glenn SB, Ojwang JO, Adler A, Kim K, et al. 2012. Evaluation of TRAF6 in a large multiethnic lupus cohort. *Arthritis and Rheumatism* 64(6):1960–1969.
- Navasa M, Follo A, Filella X, Jiménez W, Francitorra A, Planas R, Rimola A, Arroyo V, Rodés J. 1998. Tumor necrosis factor and interleukin-6 in spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: Relationship with the development of renal impairment and mortality. *Hepatology* 27(5):1227–1232.
- Negroni A, Pierdomenico M, Cucchiara S, Stronati L. 2018. NOD2 and inflammation: current insights. *Journal of Inflammation Research* Volume 11:49–60.
- Nischalke HD, Berger C, Aldenhoff K, Thyssen L, Gentemann M, Grünhage F, Lammert F, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U, et al. 2011. Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron 2 polymorphisms are associated with increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology* 55(5):1010–1016.
- Noreen M, Arshad M. 2015. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunologic Research* 62(2):234–252.
- O’Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. 1998. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 42(1):29–35.
- Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science (New York, N.Y.)* 248(4962):1517–1523.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, et al. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 411(6837):603–606.
- Proctor E, Chatamra K. 1983. Controlled induction of cirrhosis in the rat. *British Journal of Experimental Pathology* 64(3):320–330.
- Rapley R, Harbron S (Eds.). 2012. *Molecular analysis and genome discovery*, Chichester: Wiley-Blackwell.
- Ratelle M, Perreault S, Villeneuve J-P, Tremblay L. 2014. Association between proton pump inhibitor use and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology* 28(6):330–334.

- Raychaudhuri S, Thomson BP, Remmers EF, Eyre S, Hinks A, Guiducci C, Catanese JJ, Xie G, Stahl EA, Chen R, et al. 2009. Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nature Genetics* 41(12):1313–1318.
- Reddy KR, O’Leary JG, Kamath PS, Fallon MB, Biggins SW, Wong F, Patton HM, Garcia-Tsao G, Subramanian RM, Thacker LR, et al. 2015. High risk of delisting or death in liver transplant candidates following infections: Results from the North American consortium for the study of end-stage liver disease: Delisting or Death Following Infections. *Liver Transplantation* 21(7):881–888.
- Rimola A, García-Tsao G, Navasa M, Piddock LJV, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. 2000. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. *Journal of Hepatology* 32(1):142–153.
- Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM. 2009. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *American Journal of Epidemiology* 169(4):505–514.
- Rothwell S, Cooper RG, Lundberg IE, Miller FW, Gregersen PK, Bowes J, Vencovsky J, Danko K, Limaye V, Selva-O’Callaghan A, et al. 2016. Dense genotyping of immune-related loci in idiopathic inflammatory myopathies confirms HLA alleles as the strongest genetic risk factor and suggests different genetic background for major clinical subgroups. *Annals of the Rheumatic Diseases* 75(8):1558–1566.
- Rovin BH, Lu L, Saxena R. 1999. A Novel Polymorphism in the MCP-1 Gene Regulatory Region That Influences MCP-1 Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259(2):344–348.
- Saab S, Hernandez JC, Chi AC, Tong MJ. 2009. Oral Antibiotic Prophylaxis Reduces Spontaneous Bacterial Peritonitis Occurrence and Improves Short-Term Survival in Cirrhosis: A Meta-Analysis. *The American Journal of Gastroenterology* 104(4):993–1001.
- Salama MK, Sabry D, Al-Ghussein MA, Ahmed R, AbdAllah S, Taha FM, Fathy W, Wadie MS, Nabih M, Abul-Fotouh A, et al. 2014. Molecular detection of monocyte chemotactic protein-1 polymorphism in spontaneous bacterial peritonitis patients. *World Journal of Gastroenterology* 20(33):11793.
- Sandling JK, Garnier S, Sigurdsson S, Wang C, Nordmark G, Gunnarsson I, Svenungsson E, Padyukov L, Sturfelt G, Jönsen A, et al. 2011. A candidate gene study of the type I interferon pathway implicates IKBKE and IL8 as risk loci for SLE. *European Journal of Human Genetics* 19(4):479–484.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)* 307(5712):1098–1101.

- Sargenti K, Prytz H, Strand A, Nilsson E, Kalaitzakis E. 2015. Healthcare-associated and nosocomial bacterial infections in cirrhosis: predictors and impact on outcome. *Liver International* 35(2):391–400.
- Savenije OE, Mahachie John JM, Granell R, Kerkhof M, Dijk FN, de Jongste JC, Smit HA, Brunekreef B, Postma DS, Van Steen K, et al. 2014. Association of IL33–IL-1 receptor–like 1 (IL1RL1) pathway polymorphisms with wheezing phenotypes and asthma in childhood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134(1):170–177.
- Saxena R, Gianniny L, Burt NP, Lyssenko V, Giuducci C, Sjögren M, Florez JC, Almgren P, Isomaa B, Orho-Melander M, et al. 2006. Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes* 55(10):2890–2895.
- Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59(6):1035–1048.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7):671–675.
- Schuppan D, Afdhal NH. 2008. Liver cirrhosis. *The Lancet* 371(9615):838–851.
- Schwabl P, Bucsics T, Soucek K, Mandorfer M, Bota S, Blacky A, Hirschl AM, Ferlitsch A, Trauner M, Peck-Radosavljevic M, et al. 2015. Risk factors for development of spontaneous bacterial peritonitis and subsequent mortality in cirrhotic patients with ascites. *Liver International* 35(9):2121–2128.
- Scofield RH, Bruner GR, Kelly JA, Kilpatrick J, Bacino D, Nath SK, Harley JB. 2003. Thrombocytopenia identifies a severe familial phenotype of systemic lupus erythematosus and reveals genetic linkages at 1q22 and 11p13. *Blood* 101(3):992–997.
- Seeley JJ, Ghosh S. 2017. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *Journal of Leukocyte Biology* 101(1):107–119.
- Shah BR, Hux JE. 2003. Quantifying the Risk of Infectious Diseases for People With Diabetes. *Diabetes Care* 26(2):510–513.
- Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. 2013. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 13(12):875–887.
- Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. 2008. Reduced -defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 57(7):903–910.
- Song Z, Yao C, Yin J, Tong C, Zhu D, Sun Z, Jiang J, Shao M, Zhang Y, Deng Z, et al. 2012. Genetic variation in the TNF receptor-associated factor 6 gene is associated with susceptibility to sepsis-induced acute lung injury. *Journal of Translational Medicine* 10:166.

- Su L, Chen Z, Yan Y, Liang B, Xie J, Chen Q, Tan J, Gu L. 2015. Association Between TRAF6 Gene Polymorphisms and Susceptibility of Ischemic Stroke in Southern Chinese Han Population. *Journal of Molecular Neuroscience* 57(3):386–392.
- Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. 2011. Interleukin-6 (IL-6) Regulates Claudin-2 Expression and Tight Junction Permeability in Intestinal Epithelium. *Journal of Biological Chemistry* 286(36):31263–31271.
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. 2002. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics* 3(5):391–397.
- Tan G, Liang E, Liao K, Deng F, Zhang W, Chen Y, Xu J, Zhi F. 2016. NOD2 up-regulates TLR2-mediated IL-23p19 expression via NF- κ B subunit c-Rel in Paneth cell-like cells. *Oncotarget* 7(39).
- Teltschik Z, Wiest R, Beisner J, Nuding S, Hofmann C, Schoelmerich J, Bevins CL, Stange EF, Wehkamp J. 2012. Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to compromised paneth cell antimicrobial host defense. *Hepatology* 55(4):1154–1163.
- The International HapMap Project. 2003. *Nature* 426(6968):789–796.
- Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenö P, Arrieumerlou C, Hall MN. 2007. PRAS40 and PRR5-Like Protein Are New mTOR Interactors that Regulate Apoptosis (M Cookson, Ed). *PLoS ONE* 2(11):e1217.
- Thevaranjan N, Puchta A, Schulz C, Naidoo A, Szamosi JC, Verschoor CP, Loukov D, Schenck LP, Jury J, Foley KP, et al. 2017. Age-Associated Microbial Dysbiosis Promotes Intestinal Permeability, Systemic Inflammation, and Macrophage Dysfunction. *Cell Host & Microbe* 21(4):455-466.e4.
- Thunø M, Macho B, Eugen-Olsen J. 2009. suPAR: The molecular crystal ball. *Disease Markers*(3,4):157–172.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115–e115.
- Veltkamp M, Wijnen PAHM, Van Moorsel CHM, Rijkers GT, Ruven HJT, Heron M, Bekers O, Claessen AME, Drent M, Van Den Bosch JMM, et al. 2007. Linkage between Toll-like receptor (TLR) 2 promotor and intron polymorphisms: functional effects and relevance to sarcoidosis: Linkage between TLR-2 promotor and intron polymorphisms. *Clinical & Experimental Immunology* 149(3):453–462.
- Walsh MC, Lee J, Choi Y. 2015. Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunological Reviews* 266(1):72–92.

- Wang X, Spandidos A, Wang H, Seed B. 2012. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Research* 40(D1):D1144–D1149.
- Wang Y, Zhang B, Zhang L, An L, Xu J, Li D, Choudhary MN, Li Y, Hu M, Hardison R, et al. 2017. The 3D Genome Browser: a web-based browser for visualizing 3D genome organization and long-range chromatin interactions.
- Ward LD, Kellis M. 2012. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Research* 40(Database issue):D930–934.
- Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. 2004. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2–mediated T helper type 1 responses. *Nature Immunology* 5(8):800–808.
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, et al. 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53(11):1658–1664.
- West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS, Ghosh S. 2011. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472(7344):476–480.
- Wi SM, Moon G, Kim J, Kim S-T, Shim J-H, Chun E, Lee K-Y. 2014. TAK1-ECSIT-TRAF6 complex plays a key role in the TLR4 signal to activate NF- κ B. *The Journal of Biological Chemistry* 289(51):35205–35214.
- Wiest R, Lawson M, Geuking M. 2014. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology* 60(1):197–209.
- Wilhelm J. 2003. Entwicklung real-time-PCR-basierter Methoden für die moderne DNA-Analytik. [Inauguraldissertation], Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.
- World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 2013. *JAMA* 310(20):2191.
- Xinwei A. 2012. Differential mRNA Expression of IRAK1, TRAF6, KAL1 and GAN in Response to HPV16 Infection. Fordham University, New York.
- Xiong Y, Qiu F, Piao W, Song C, Wahl LM, Medvedev AE. 2011. Endotoxin Tolerance Impairs IL-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK) 4 and TGF- β -activated Kinase 1 Activation, K63-linked Polyubiquitination and Assembly of IRAK1, TNF Receptor-associated Factor 6, and I B Kinase and Increases A20 Expression. *Journal of Biological Chemistry* 286(10):7905–7916.

- Yadav A, Saini V, Arora S. 2010. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clinica Chimica Acta* 411(21–22):1570–1579.
- Yang XR, Pfeiffer RM, Wheeler W, Yeager M, Chanock S, Tucker MA, Goldstein AM. 2009. Identification of modifier genes for cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with and without *CDKN2A* mutations. *International Journal of Cancer* 125(12):2912–2917.
- Yang Y, Yin C, Pandey A, Abbott D, Sassetti C, Kelliher MA. 2007. NOD2 Pathway Activation by MDP or *Mycobacterium tuberculosis* Infection Involves the Stable Polyubiquitination of Rip2. *Journal of Biological Chemistry* 282(50):36223–36229.
- Yin Q, Lin S-C, Lamothe B, Lu M, Lo Y-C, Hura G, Zheng L, Rich RL, Campos AD, Myszka DG, et al. 2009. E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. *Nature Structural & Molecular Biology* 16(6):658–666.
- Yoshida R, Takaesu G, Yoshida H, Okamoto F, Yoshioka T, Choi Y, Akira S, Kawai T, Yoshimura A, Kobayashi T. 2008. TRAF6 and MEKK1 Play a Pivotal Role in the RIG-I-like Helicase Antiviral Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 283(52):36211–36220.
- Zarzycka B, Seijkens T, Nabuurs SB, Ritschel T, Grommes J, Soehnlein O, Schrijver R, van Tiel CM, Hackeng TM, Weber C, et al. 2015. Discovery of Small Molecule CD40–TRAF6 Inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling* 55(2):294–307.
- Zhou A, Scoggin S, Gaynor RB, Williams NS. 2003. Identification of NF- κ B-regulated genes induced by TNF α utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* 22(13):2054–2064.
- Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, Nattermann J, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. 2011. Interleukin-8 Is Activated in Patients with Chronic Liver Diseases and Associated with Hepatic Macrophage Accumulation in Human Liver Fibrosis (A Bertolotti, Ed). *PLoS ONE* 6(6):e21381.
- Zimmermann HW, Reuken PA, Koch A, Bartneck M, Adams DH, Trautwein C, Stallmach A, Tacke F, Bruns T. 2013. Soluble urokinase plasminogen activator receptor is compartmentally regulated in decompensated cirrhosis and indicates immune activation and short-term mortality. *Journal of Internal Medicine* 274(1):86–100.
- Zintzaras E. 2010. Impact of Hardy–Weinberg equilibrium deviation on allele-based risk effect of genetic association studies and meta-analysis. *European Journal of Epidemiology* 25(8):553–560.
- Zintzaras E, Lau J. 2008. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene–disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. *Journal of Clinical Epidemiology* 61(7):634–645.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ursachen und Folgen der pathologisch bakteriellen Translokation bei dekompensierter Leberzirrhose aus Bruns (2018).	4
Abbildung 2: Schmelzkurvenanalyse mit FRET-Hybridisierungs sonden zur Diskriminierung der Allelsituation des <i>TRAF6</i> SNP rs5030419.	11
Abbildung 3: Domänenstruktur des TRAF6 Proteins	18
Abbildung 4: Die zentrale Bedeutung von TRAF6 für die TLR-induzierte Immunantwort bei Monozyten und Makrophagen	19
Abbildung 5: Primer zur Analyse des alternativen Spleißens von <i>TRAF6</i> .	41
Abbildung 6: <i>Linkage Disequilibrium</i> (LD) Plot zur grafischen Veranschaulichung der <i>TRAF6</i> -Haplotypdefinition.	48
Abbildung 7: Reinheit der CD14+-Zellfraktion nach MACS-Separation.	48
Abbildung 8: DNA-Sequenzalignment und Chromatogramm der Sanger-Sequenzierung zur Validierung der FRET-basierten Schmelzkurvenanalyse der <i>TRAF6</i> SNPs rs331457 und rs5030419.	53
Abbildung 9: Vergleich der SBP Häufigkeit von Patienten mit dem <i>TRAF6</i> -Haplotyp 2 (HT2) gegenüber allen anderen <i>TRAF6</i> -Haplotypen (HT 1, 3, M).	54
Abbildung 10: Prospektive Analyse der ersten SBP-Episode.	55
Abbildung 11: Gekoppelte Analyse des <i>TRAF6</i> -Haplotyps und des <i>NOD2</i> -Genotyps als genetische Risikofaktoren auf die SBP Häufigkeit.	61
Abbildung 12: Die Assoziation des <i>TRAF6</i> -Haplotyps mit Entzündungsmarkern in sterilem, nicht-neutrozytischem Aszites und Blutserum.	66
Abbildung 13: Konsequenzen des <i>TRAF6</i> -Haplotyps für Peritonealmakrophagen und zirkulierende Monozyten bei kontinuierlicher Immunaktivierung durch bakterielle Translokation.	68
Abbildung 14: Die Bedeutung des <i>TRAF6</i> -Haplotyps für die Aktivierung der TLR-4-TRAF6-Signalkaskade.	69
Abbildung 15: Die Bedeutung des <i>TRAF6</i> -Haplotyps für die Aktivierung der TLR-4-TRAF6-Signalkaskade.	70
Abbildung 16: <i>Ex vivo</i> Zellaktivierung von (A, B, D) Peritonealmakrophagen und (C) Monozyten mit 10 ng/ml LPS.	71
Abbildung 17: mRNA Expression von <i>TRAF6</i> und seinen Spleißvarianten bei Patienten mit Leberzirrhose.	72
Abbildung 18: TRAF6 Proteinexpression in Peritonealmakrophagen	72
Abbildung 19: TRAF6 Proteinexpression in Peritonealmakrophagen (A, C, E, G) und Monozyten (B, D, F, G).	73
Abbildung 20: Die <i>PRR5L</i> mRNA Expression in Peritonealmakrophagen nach 24 Stunden Zellkultur ohne Stimulation (A) und mit 10 ng/ml LPS (B)	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Western Blot Antikörper	29
Tabelle 2: Sequenzen der Genotypisierungsprimer und -sonden	36
Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer	40
Tabelle 4: Patientencharakteristika der verschiedenen <i>TRAF6</i> -Haplotypen	50
Tabelle 5: Konformität der Genotyp-Häufigkeiten der <i>TRAF6</i> SNPs rs331457 und rs5030419 in der Studienpopulation mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz	52
Tabelle 6: <i>TRAF6</i> -Haplotypen	52
Tabelle 7: Risikofaktoren für die erste Episode einer spontan bakteriellen Peritonitis	57
Tabelle 8: Patientencharakteristika der verschiedenen <i>TRAF6</i> -Haplotypen bei Patienten ohne HCC	58
Tabelle 9: Verteilung der <i>TRAF6</i> -Haplotypen in den Subgruppen Alkoholische und Nicht-alkoholische Leberzirrhose	59
Tabelle 10: Risikofaktoren für eine SBP in den Ätiologie-Subgruppen	60
Tabelle 11: Risikofaktoren für eine SBP in Abhängigkeit des mikrobiologischen Kulturergebnisses	62
Tabelle 12: Prädiktoren für die Überlebenszeit	63
Tabelle 13: Charakteristika der ersten SBP-Episode entsprechend des <i>TRAF6</i> -Haplotyps	64
Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse für <i>TRAF6</i> -Haplotyp 2 im Vergleich zu allen anderen <i>TRAF6</i> -Haplotypen (1, 3, M)	76

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mir während meiner Dissertationszeit unterstützend zur Seite standen.

Einen herzlichen Dank richte ich an Herrn Professor Dr. Andreas Stallmach und Professor Dr. Ignacio Rubio für die Betreuung meiner Promotionsarbeit, die Diskussionen zu aktuellen Problemen und Fortschritten und dafür, dass Sie mich an Ihren Erfahrungen teilhaben ließen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Tony Bruns, der mir die Möglichkeit gab, mich in ein so anspruchsvolles und abwechslungsreiches Thema einzubringen und mir stets mit Rat und Tat, sowie tröstenden oder erheiternden Worten zur Seite stand. Die gemeinsamen Diskussionen haben mich immer wieder inspiriert und motiviert. Darüber hinaus danke ich ihm für seine unendliche Geduld, sein Verständnis und sein Vertrauen, die es mir ermöglichten meine Arbeiten mit meinem Familienleben zu vereinbaren. Mit ihm und meinen Kolleginnen und Kollegen des Forschungslabors Gastroenterologie zusammenzuarbeiten war mir stets eine Freude. Ihnen allen danke ich für das freundliche und interessierte Miteinander, die informativen Diskussionen, die gegenseitige Unterstützung und die amüsanten Gespräche.

Ebenso danke ich allen Patientinnen und Patienten, die durch ihre Bereitschaft zur Teilnahme an der durchgeführten Studie diese Arbeit erst ermöglicht haben sowie den am Studieneinschluss beteiligten Ärzten.

Weiterer Dank gilt Frau Beate Ziegenhardt, Frau Dr. Caroline Schmidt, Herrn Dr. Robby Markwart und Frau Yvonne Schlenker für die Kooperation und Unterstützung bei meinen Versuchen. Frau Dr. Anja Weise danke ich für stets inspirierende Diskussionen und Erklärungen im Themenfeld der Humangenetik.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meinem Mann, weil er mich stets liebevoll und ausdauernd unterstützt und mit Interesse auch detaillierten Schilderungen meiner Arbeit folgt. Zu guter Letzt danke ich meinen Kindern, weil sie mich mit ihrer ausgelassenen Unbeschwertheit in ihren Bann ziehen und immer wieder ermutigen auch die schwierigsten Probleme anzugehen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Tony Bruns,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Martina Mai